



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Instituto Superior de Agronomia

Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e
Variação Temporal Entre Espécies

Patrícia Krus Policarpo

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Doutora Sónia Cristina Nunes Salvador

Correia Pedro

Doutor Paulo José de Lemos Branco

ORIENTADORA

Doutora Sónia Cristina Nunes Salvador

Correia Pedro

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Fernando Ribeiro

Alves Afonso

2017

Lisboa



INSTITUTO
SUPERIOR DE
AGRONOMIA
Universidade de Lisboa

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Instituto Superior de Agronomia

Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e
Variação Temporal Entre Espécies

Patrícia Krus Policarpo

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA – PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

Doutora Sónia Cristina Nunes Salvador Correia

Pedro

Doutor Paulo José de Lemos Branco

ORIENTADORA

Doutora Sónia Cristina Nunes Salvador

Correia Pedro

CO-ORIENTADOR

Professor Doutor Fernando Ribeiro

Alves Afonso

2017

Lisboa

Agradecimentos

Foram diversas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, às quais desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

Ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), I.P. pela disponibilidade das condições logísticas e humanas indispensáveis à elaboração do trabalho, e em particular à Dra. Narcisa Bandarra como coordenadora da DivAV (Divisão de Aquacultura e Valorização).

À minha orientadora, Dra. Sónia Pedro, responsável do Laboratório de Microbiologia da DivAV, por me ter concedido a oportunidade de estágio no laboratório e pelo delineamento do trabalho. Agradeço o tempo e dedicação, os valiosos ensinamentos, o apoio e a orientação científica prestada ao longo da realização desta dissertação que tornaram este processo mais fácil. Agradeço também a simpatia e por todos os conhecimentos transmitidos, que serão certamente uma mais-valia no meu futuro.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Fernando Afonso, por me ter indicado o local de estágio, pela orientação e apoio dados, por estar sempre disponível para esclarecer dúvidas e pela confiança depositada em mim.

À Sara Costa, à Patrícia Oliveira, e à Fernanda Oliveira, bolsistas de investigação no Laboratório de Microbiologia da DivAV, por toda a orientação técnica, todos os bons conselhos, todas as respostas às minhas questões, apoio no laboratório e ótimo ambiente de trabalho. Tenho a agradecer em especial à Sara por me ter ensinado as tarefas de laboratório com muita paciência nos meus primeiros dias e toda a ajuda que me concedeu, nas formalidades da escrita da dissertação e na utilização do programa de estatística, entre muitas outras. À Patrícia por ter sempre sido sempre sincera e ter valorizado o meu trabalho no laboratório, para além de ter tido o esforço de ler a minha dissertação e ajudar a melhorá-la. À Fernanda tenho muito a agradecer por todas as vezes que me mandou estudar, por todas as vezes que disse para eu acabar a dissertação e por toda a amizade.

Aos colegas do Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves (SNMB) que, de uma maneira ou de outra, ajudaram-me a conseguir obter este resultado final: Rui Oliveira, Patrícia Presado e Luís Oliveira. À Dra. Carla por se ter disponibilizado em auxiliar-me no tratamento estatístico dos resultados. E à Lia Godinho pela sua boa disposição e energia.

À minha mãe e avô materno, sem os quais nunca teria sido possível realizar o mestrado e esta dissertação, por me terem incentivado desde a minha infância a chegar o mais longe possível nos estudos e terem acreditado sempre nas minhas capacidades para tal. Ao meu pai e avó

paterna, que mesmo estando longe sempre acreditaram que tudo ia correr bem. À minha avó materna, que já não está presente mas será sempre o meu maior alento.

A minha amiga Ana Lúcia, por ter sempre acreditado em mim e por ter sido a pessoa com mais fé, agradeço muito.

Ao restante da minha família e aos meus amigos que proporcionaram sempre momentos de distração quando não deviam, mas que sempre me incentivaram na realização deste trabalho.

Ao Diogo de Matos, não existem palavras que consigam exprimir o que tenho de lhe agradecer, foi quem mais me motivou, quem disse sempre que ainda tinha tempo, que eu era capaz, que ia fazer um bom trabalho, em suma disse tudo o que precisava ouvir. Esteve sempre do meu lado e ajudou-me em tudo o que conseguiu, e mais um pouco.

Resumo

Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Sazonal Entre Espécies

A produção e o consumo de moluscos bivalves são importantes a nível nacional, assim como em muitos outros países. Os bivalves acumulam microrganismos e são consumidos crus ou levemente cozinhados, como consequência podem ser vetores de diversos agentes nocivos. Neste trabalho foi avaliado o efeito de armazenamento/transporte às temperaturas de 1 °C e 10 °C, durante 24 e 48 h na qualidade microbiológica de bivalves vivos. Foram estudadas sete espécies, nomeadamente, *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis corrugata*, *Callista chione*, *Ensis* sp., *Mytilus edulis* e *Crassostrea gigas*. Os parâmetros microbiológicos determinados foram: a contagem de microrganismos viáveis totais e quantificação de coliformes e de *E. coli*. Também se avaliou o efeito temporal e da espécie na qualidade microbiológica de *Callista chione*, *Donax trunculus* e *Ensis* sp. provenientes de uma zona de produção no litoral e com a mesma data de colheita. Procedeu-se à determinação de microrganismos viáveis totais, coliformes, *E. coli*, estreptococos fecais, esporos sulfito-redutores, pseudomonas e vibrios.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de *E. coli* nas condições testadas, pelo que o transporte de moluscos bivalves vivos destinados a ensaios microbiológicos de acordo com a ISO 6887-3 (2017) são adequadas para o controlo oficial das zonas de produção. No entanto, devido a uma multiplicação significativa ($p < 0,05$) de microrganismos viáveis totais a 10 °C, o transporte de bivalves vivos para comercialização deve ser realizado abaixo de 10 °C.

Verificou-se que no inverno ocorriam os menores níveis de contaminação para a maior parte dos parâmetros avaliados, enquanto no verão foram registados os teores mais elevados de coliformes, *E. coli*, pseudomonas e vibrio. Assim recomenda-se que os moluscos bivalves capturados no verão sejam refrigerados com a maior brevidade possível.

Callista chione apresentou os menores níveis de contaminação para a maior parte dos parâmetros avaliados. Por outro lado, *Ensis* sp. foi a espécie que apresentou maiores níveis de contaminação. Assim, é recomendável que a monitorização microbiológica da zona de produção estudada continue a incluir as três espécies estudadas.

Palavras-chave: moluscos bivalves vivos; temperatura; armazenamento/transporte; qualidade microbiológica; sazonalidade; efeito da espécie.

Abstract

Live Bivalve Microbiological Characterisation: Effect of Transport and Inter-species Seasonal Variation

The production and consumption of bivalve molluscs is relevant at national level, as well as in several other countries. Bivalves accumulate microorganisms and are consumed raw or lightly cooked, therefore they can be vectors of several harmful agents for humans. In this work the effect of storage/transport at 1 °C and 10 °C for 24 and 48 h in the microbiological quality of live bivalves was assessed. The following seven bivalve species, namely, *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis corrugata*, *Callista chione*, *Ensis* sp., *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*, were studied. The performed microbiological tests were: total viable counts and quantification of coliforms and *E. coli*. The effect of seasonal and species variation on the microbiological quality of *Callista chione*, *Donax trunculus* and *Ensis* sp., from the same production area also evaluated. Total viable microorganisms, coliforms, *E. coli*, faecal streptococci, sulphite-reducing spores, pseudomonas and vibrios were determined.

No significant differences were observed in *E. coli* levels at the tested conditions. So the transport of bivalve samples for official control of harvesting areas according to ISO 6887-3 (2017) is adequate. However, due to a significant growth ($p < 0.05$) of total viable microorganisms at 10 °C, transport of live bivalves for marketing should be performed below 10 °C.

During winter lower levels of microbiological contamination were detected. During summer higher levels of faecal contamination, pseudomonas and vibrio, were observed. So rapid refrigeration after bivalve capture is recommended during summer.

Callista chione presented the lower levels of contamination for the tested parameters; on contrary, *Ensis* sp. showed the higher levels. So, the microbiological monitoring of this species in the studied production area is advised.

Key words: live bivalve mollusc; temperature; storage/transport; microbiological quality; seasonality; species effect.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Introdução	1
1. Revisão Bibliográfica	5
1.1 Importância dos Moluscos Bivalves	5
1.2 Bioecologia dos Bivalves.....	8
1.3 Qualidade Microbiológica	13
1.4 Classificação e Monitorização Microbiológica das Zonas de Produção	16
1.5 Depuração, Afinação e Transformação.....	22
2. Materiais e Métodos	27
2.1 Materiais	27
2.2 Parâmetros Microbiológicos	29
2.3 Tratamento de Resultados.....	35
3. Resultados e Discussão	37
3.1 Ensaio I	37
3.2 Ensaio II.....	42
Conclusão	53
Bibliografia	55

Índice de Figuras

Figura 1 Volume e valor da produção mundial de aquacultura de plantas e animais aquáticos (1995-2014).	6
Figura 2 Produção global de moluscos.....	7
Figura 3 Estrutura do volume de produção em aquacultura, por espécie (2014-2015).....	8
Figura 4 Esquema de um molusco bivalve.....	9
Figura 5 Ciclo de vida de um bivalve.....	9
Figura 6 Litoral Setúbal - Sines (L6).....	19
Figura 7 Centro de depuração.....	23
Figura 8 Imagens das espécies de bivalves ensaiadas.	28
Figura 9 Abertura da amostra em assepsia.	29
Figura 10 Placa de Petri (90 mm) com crescimento de microrganismos viáveis totais.	31
Figura 11 Placa de Petri com meio seletivo para o crescimento diferenciado por cores de <i>E. coli</i> e coliformes.	32
Figura 12 Placa de Petri com crescimento de estreptococos fecais em meio KF.....	33
Figura 13 Placa de Petri com crescimento de colônias (amarelas e verdes) características de <i>Vibrio</i>	34
Figura 14 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de microrganismos viáveis totais obtidos no inverno, primavera e verão.	42
Figura 15 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de coliformes obtidos no inverno, primavera e verão.	43
Figura 16 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de <i>E. coli</i> obtidos no inverno, primavera e verão.	44
Figura 17 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de estreptococos fecais obtidos no inverno, primavera e verão.	45
Figura 18 Frequência dos teores de esporos sulfito-redutores obtidos no inverno, primavera e verão.	45
Figura 19 Frequência dos teores de pseudomonas obtidos no inverno, primavera e verão.	46
Figura 20 Frequência dos teores de vibrio obtidos no inverno, primavera e verão.....	46
Figura 21 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de microrganismos viáveis totais em ameijola, conculha e longueirão.....	47
Figura 22 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de coliformes em ameijola, conculha e longueirão.....	48
Figura 23 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de <i>E. coli</i> em ameijola, conculha e longueirão.	49
Figura 24 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor estreptococos fecais em ameijola, conculha e longueirão.....	49
Figura 25 Frequência dos teores de esporos sulfito-redutores em ameijola, conculha e longueirão.	50
Figura 26 Frequência dos teores de pseudomonas em ameijola, conculha e longueirão.	50
Figura 27 Frequência dos teores de vibrios em ameijola, conculha e longueirão.....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1 Teores de microrganismos viáveis totais (UFC/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas.	38
Tabela 2 Teores de coliformes totais (NMP/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas.	39
Tabela 3 Teores de <i>E. coli</i> (NMP/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas.	40
Tabela 4 Teores de microrganismos viáveis totais (UFC/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.	40
Tabela 5 Teores de coliformes totais (NMP/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.	41
Tabela 6 Teores de <i>E. coli</i> (NMP/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.	41

Introdução

Em Portugal, a apanha, captura e comercialização de moluscos bivalves vivos são atividades relevantes, dada a sua elevada importância socio económica e o seu interesse gastronómico (Nunes, 2008).

Os moluscos bivalves são invertebrados de corpo mole não segmentado, cobertos por uma concha constituída por duas peças (valvas) que se articulam dorsalmente, exclusivamente aquáticos, maioritariamente marinhos, bênticos infaunais ou epifaunais, geralmente sésseis, que se encontram distribuídos por todo o globo a várias profundidades. Os bivalves são animais poiquilotérmicos, filtradores, de regime micrófago (suspensívoros ou detritívoros), alimentando-se maioritariamente de fitoplâncton e partículas orgânicas em suspensão (Gosling, 2004). No processo de filtração, os bivalves podem concentrar vários contaminantes, incluindo microrganismos patogénicos (Solic, Krustulovic, Jozic & Curac, 1999). Esses microrganismos podem ter origem humana ou de outros animais homeotérmicos, provenientes de águas residuais, escoamentos urbanos ou até da fauna selvagem. O consumo pelo Homem destes animais crus ou insuficientemente cozinhados, colhidos em zonas de águas contaminadas, pode causar doenças como gastroenterites e ainda originar surto de doenças infecciosas (Lees, 2000).

Os problemas de saúde humana associados ao consumo de moluscos bivalves crus ou pouco cozinhados são amplamente conhecidos, chegando a existir registos de ocorrência que remontam à época medieval. De facto, esta associação foi documentada no final do século XIX com numerosos surtos de febre tifoide em vários países (Allen, 1899 citado por Lees 2000).

Uma vez que este género alimentício pode constituir um importante vetor de transmissão de doenças infecciosas de origem entérica, é possível recorrer à utilização de indicadores de contaminação fecal, como a concentração em coliformes fecais, pois estes, sendo naturais da microflora intestinal de seres homeotérmicos, têm a mesma origem que os microrganismos patogénicos entéricos humanos (Frost, Craun & Calderon, 1996). A *Escherichia coli* é uma bactéria coliforme fecal e foi estabelecida como um indicador de contaminação fecal, sendo a sua ausência em produtos alimentares indicadora de condições sanitárias adequadas (Baylis, Uyttendaele, Joosten & Davies, 2011).

Na União Europeia, o risco de contaminação fecal em moluscos bivalves vivos é estimado a partir da determinação da concentração de *E. coli* em amostras de séries temporais de cada zona de produção (Lee & Silk, 2013).

Há poucas informações sobre se as diferentes concentrações de indicadores microbianos observadas em bivalves refletem alterações reais no teor provável de patogénicos. Embora os aspetos relacionados com a atividade biológica específica de cada espécie possam afetar os indicadores de contaminação microbiológica e os agentes patogénicos de forma semelhante, sabe-se também que as taxas de depuração são marcadamente diferentes para indicadores bacterianos e agentes patogénicos virais, inviabilizando qualquer relação entre acumulação de bactérias indicadoras e a acumulação de agentes patogénicos virais (Lees, 2000).

De acordo com o Regulamento (Reg.) nº 854/2004/CE da União Europeia e respetivas alterações, as autoridades competentes, e a nível nacional, de acordo com a Portaria nº 1421/2006, o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.), têm a responsabilidade de monitorizar e classificar as zonas de produção de moluscos bivalves vivos. As áreas de produção são classificadas como A, B, C dependendo do conteúdo de *E. coli* nas partes moles e na água intravalvar dos bivalves, preferencialmente por espécie, quando apropriado. Os bivalves provenientes das zonas de produção classificadas como A podem ir diretos para o consumo humano, enquanto os bivalves provenientes das zonas B e C são destinados à depuração e afinação, respetivamente, ou transformação.

Muitas das espécies de bivalves comercializadas a nível nacional, encontram-se em bancos naturais situados em zonas litorais e em estuários (IPMA, 2017b). Enquanto as zonas de produção litorais estão menos sujeitas a pressões antropogénicas, as zonas estuarinas encontram-se frequentemente próximas de centros urbanos, onde os níveis de nutrientes são altos e há bastante poluição (Lees, 2000). Neste contexto, no momento da captura, as espécies capturadas nas zonas de produção litorais exibem habitualmente um nível de contaminação menos elevado do que as provenientes de zonas estuarino-lagunares (Despacho nº 1851/2017).

Dada a diferente bioecologia das espécies de bivalves, é expectável a ocorrência de variações no teor e tipologia da contaminação microbiológica, mesmo para espécies provenientes da mesma zona. De facto, podem ser observadas diferenças na contaminação por *E. coli* entre diversas espécies de bivalves, devido à interação de vários fatores, incluindo a sua atividade biológica (taxa de captação e filtração) e a sua localização na coluna de água/substrato. A atividade biológica também pode ser afetada pela estação do ano, temperatura da água e salinidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), esses fatores influenciam o número de episódios de contaminação detetados em diferentes espécies.

De modo a que nos vários Estados Membros da EU os resultados analíticos dos controlos oficiais sejam comparáveis e o nível da proteção do consumidor seja equivalente, encontram-se estabelecidos no Reg. nº 2073/2005 os métodos de referência para os critérios

microbiológicos. O método para a deteção e quantificação de *E. coli* em moluscos bivalves é o método do número mais provável (NMP) segundo a ISO 16649-3 (*International Organization for Standardization*, 2015).

No entanto, a concentração de *E. coli* nas amostras de bivalves vivos pode variar durante o transporte, devido às condições de armazenamento. Esta variação pode afetar a qualidade microbiológica da amostra e, consequentemente, o estatuto sanitário da zona de produção, e desse modo, influenciar o nível de proteção de saúde pública concedido aos consumidores (*Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*, CEFAS, 2017). Por outro lado, durante o transporte dos bivalves vivos para os vários circuitos comerciais, em particular para os centros de depuração e expedição, é essencial assegurar, além da respetiva viabilidade, que não há deterioração da respetiva qualidade microbiológica. De facto, o modo de acondicionamento utilizado para o transporte de moluscos pode também afetar a sua viabilidade. A orientação da embalagem das ostras e vieiras tem, tradicionalmente, sido com a valva convexa para baixo, de forma a permitir a retenção da água dentro da cavidade do manto (Duncan, 1993). Por outro lado, é importante realçar que a sobrevivência das bactérias nos bivalves depende, em parte, da atividade bactericida da hemolinfa destes animais (Canessi *et al.*, 2013).

Do ponto de vista laboratorial, a ISO 6882-3 (2017) estabelece que o transporte ou conservação de amostras de bivalves vivos destinadas a ensaios microbiológicos deve ser realizado no intervalo de temperatura de 0 °C a 10 °C e que as análises devem ser iniciadas até 24 h após a colheita das amostras. Adicionalmente, o Laboratório Europeu de Referência para as contaminações bacterianas e virais dos moluscos bivalves (CEFAS, Weymouth, Reino Unido) recomenda que o transporte das amostras de bivalves vivos destinadas a ensaios microbiológicos, seja realizado a temperaturas entre 0 °C a 10 °C, com início dos ensaios até 48 horas após a captura dos exemplares (CEFAS, 2017).

Apesar dos teores de *E. coli* não tenderem a aumentar em bivalves vivos armazenados até 10°C durante 72 h (Cook & Ruple, 1989), o armazenamento prolongado a baixas temperaturas pode resultar em reduções nas contagens de *E. coli* (Lee & Murray, 2010). Relativamente a outras espécies e grupos bacterianos, alguns com características psicrotróficas, desconhece-se o respetivo comportamento nas condições específicas na ISO 6887-3 (2017).

Tendo em consideração o exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar: o efeito do tempo e temperatura de transporte de bivalves vivos na respetiva qualidade microbiológica, assim como caracterizar a variação temporal e entre espécies de bivalves vivos da respetiva qualidade microbiológica. O presente trabalho teve como objetivos específicos:

1. Quantificar os teores de microrganismos viáveis totais, coliformes e *E. coli* em amostras de sete espécies de bivalves vivos, simulando temperaturas de transporte a 1 °C e a 10 °C, durante 24 h e 48 h.
2. Determinar o teor de microrganismos viáveis totais, coliformes, *E. coli*, estreptococos fecais, esporos sulfito-redutores, pseudomonas e vibrios em três espécies de bivalves provenientes da mesma zona de produção, durante três estações do ano (inverno, primavera e verão).

Para além da presente “Introdução” e da “Conclusão”, este trabalho encontra-se dividido em três capítulos, a seguir indicados.

No capítulo 1, faz-se uma revisão bibliográfica sobre a bioecologia das principais espécies de bivalves, abordam-se os principais aspetos da qualidade microbiológica destes animais, nomeadamente no que se refere aos principais parâmetros indicadores de contaminação, a importância das condições de transporte das amostras deste género alimentício destinadas a ensaios microbiológicos, e, por fim, classificação das zonas de produção de moluscos bivalves.

No capítulo 2 expõem-se as metodologias utilizadas para o ensaio I, em que se avaliou o efeito de diferentes condições de transporte na qualidade microbiológica dos bivalves vivos, e descrevem-se as metodologias empregues no ensaio II, em que se avaliou a variação interespecífica e temporal da contaminação microbiana em bivalves. As figuras apresentadas neste capítulo são de autoria própria.

No capítulo 3 descrevem-se e discutem-se os resultados obtidos nos ensaios realizados.

Por fim, na "Conclusão" apresentam-se as principais conclusões do trabalho e algumas sugestões de temas a desenvolver em estudos posteriores.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Importância dos Moluscos Bivalves

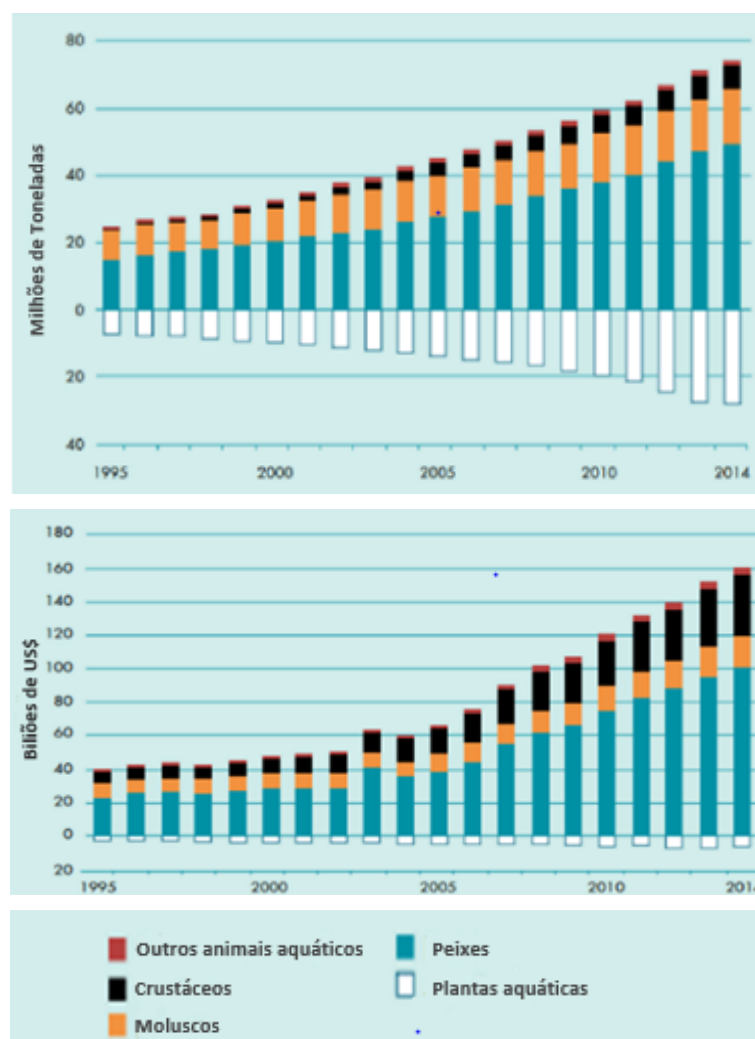
De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a aquacultura é o “cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes moluscos, crustáceos e plantas aquáticas”. Nas duas últimas décadas, o crescimento da produção em aquacultura impulsionou o consumo médio de peixes e produtos da pesca a nível global. A mudança para um consumo relativamente maior de espécies cultivadas em comparação com o peixe selvagem atingiu um marco em 2014 quando o contributo do setor de produção de espécies cultivadas para o consumo humano superou pela primeira vez as espécies selvagens. Isto representa um aumento significativo, uma vez que a participação da aquacultura na oferta total evoluiu de 7 % em 1974, para 26 % em 1994 e para 39 % em 2004 (FAO, 2016), sendo que em 2014 foi superior a 52 %.

Os moluscos bivalves por serem filtradores pouco exigentes em termos de alimentação e por requererem técnicas de manejo simples, são ideais para produzir em aquacultura (Nunes, 2008). O aumento da produção de moluscos na aquacultura e, como consequência, o declínio relativo do preço, contribuiu para o aumento da disponibilidade anual *per capita* de 0,8 kg em 1961 para 3,1 kg em 2013 (FAO, 2016).

O consumo de peixes e produtos da pesca também foi influenciado pela globalização nos sistemas alimentares e por inovações e melhorias no processamento, transporte, distribuição, comercialização e ciência e tecnologia dos alimentos. Esses fatores levaram a melhorias na eficiência, em custos mais baixos, em opções mais amplas e em produtos mais seguros e melhorados (FAO, 2016, p.78, tradução livre).

A produção em aquacultura em 2014 ascendeu a 73,8 milhões de toneladas, sendo 49,8 milhões de toneladas de peixe, 16,1 milhões de toneladas de moluscos, 6,9 milhões de toneladas de crustáceos e 7,3 milhões de toneladas de outros animais aquáticos. Na Fig. 1 temos a evolução da massa e valor da produção de aquacultura de 1995 a 2014 (FAO, 2016).

Figura 1 Massa e valor da produção mundial de aquacultura de plantas e animais aquáticos (1995-2014).

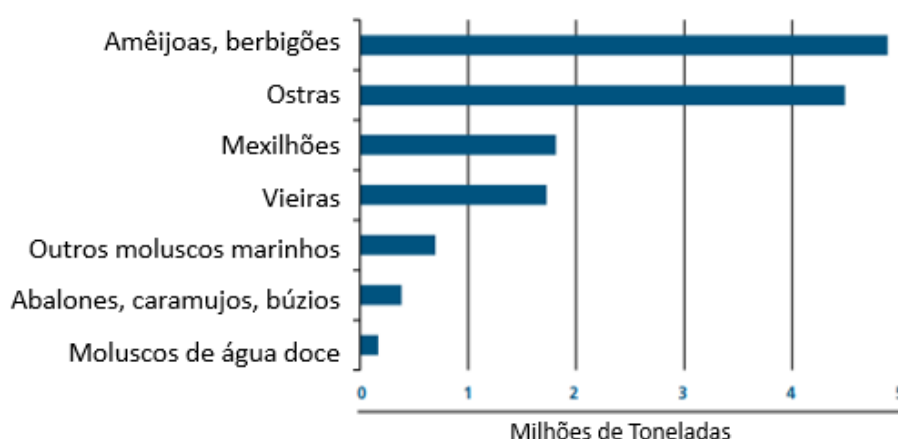


Fonte: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2016 (adaptado).

Na aquacultura existem três sistemas de produção, nomeadamente o extensivo, semi-extensivo e intensivo, que são diferenciados pelos níveis de controlo da produção e fornecimento de alimentos. Na produção em regime extensivo e semi-intensivo não há interferência humana no ambiente onde as espécies se desenvolvem. Em 2014, a cultura das espécies animais não alimentadas produziu 22,7 milhões de toneladas, representando 30,8% da produção mundial de todas as espécies cultivadas. As espécies animais mais importantes não alimentadas incluem duas espécies de carpas e moluscos bivalves em áreas marinhas e costeiras. A Europa produziu 632 000 toneladas de bivalves em 2014, sendo que os principais produtores foram Espanha (223 000 toneladas), França (155 000 toneladas) e Itália (111 000 toneladas) (FAO, 2016).

Uma parte significativa da produção global de moluscos marinhos, particularmente na Europa e América, depende da amêijoia japonesa (*Ruditapes philippinarum*), amplamente introduzida, e ostra gigante (*Crassostrea gigas*), como se pode observar na Fig. 2 (FAO, 2012).

Figura 2 Produção global de moluscos.



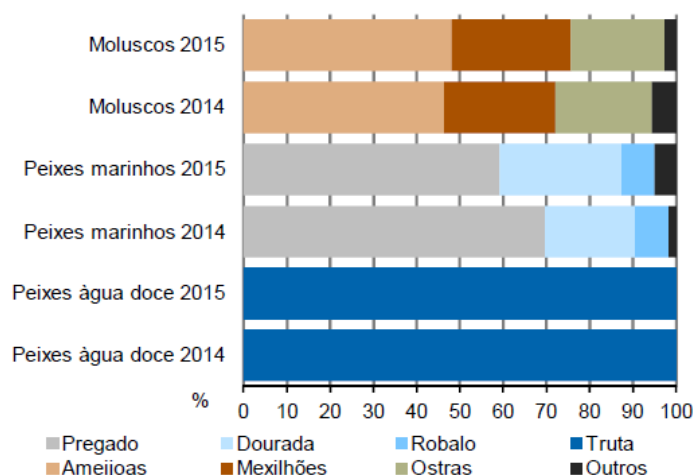
Fonte: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2012 (adaptado).

Os hábitos alimentares da população portuguesa e sul da Europa, conhecidos como mediterrânicos, têm como importante componente os produtos da pesca, sendo os bivalves bastante apreciados, principalmente no verão (Mena *et al.*, 2004).

Em Portugal, a produção de aquacultura em 2015 (9 561 toneladas) gerou uma receita de 54,1 milhões de euros. Estes resultados traduzem uma diminuição em quantidade de cerca de 14,8 %, mas um acréscimo em valor de cerca de 4,0 % relativamente a 2014 (Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos, DGRM, 2016).

Os moluscos bivalves representaram 55,0 % da produção total de aquacultura, mantendo-se as amêijoas como a espécie mais relevante (2300 toneladas), seguida dos mexilhões (1315 toneladas), que registaram aumentos de produção de 2,1 % e 5,7 %, respetivamente, relativamente ao ano de 2014. Já a produção de ostras (1035 toneladas) diminuiu cerca de 5 %, como se pode observar na Fig. 3 (DGRM, 2016).

Figura 3 Estrutura do volume de produção em aquacultura, por espécie (2014-2015).



Fonte: Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos, 2016

No final de 2015, existiam 1504 estabelecimentos licenciados em aquacultura para águas doces, salgadas e salobras, menos 17 unidades em relação a 2014. Em termos de área total houve um aumento de 4,0 % da dimensão média, sendo agora de 3,28 hectares por estabelecimento aquícola. Em termos do tipo de estabelecimento, a estrutura manteve-se com cerca de 87,7 % de viveiros para produção de moluscos bivalves (DGRM, 2016).

Relativamente aos regimes de exploração, na produção aquícola em águas marinhas e salobras, 54,9 % do volume total foi proveniente do regime extensivo, tendo sido utilizado sobretudo para a cultura de bivalves. Do regime intensivo teve origem 34,0 % da produção, enquanto o semi-intensivo foi responsável por apenas 11,1 %. A diminuição da produção em regime semi-intensivo deveu-se à conversão de estabelecimentos de peixe para a produção de bivalves em regime extensivo (DGRM, 2016).

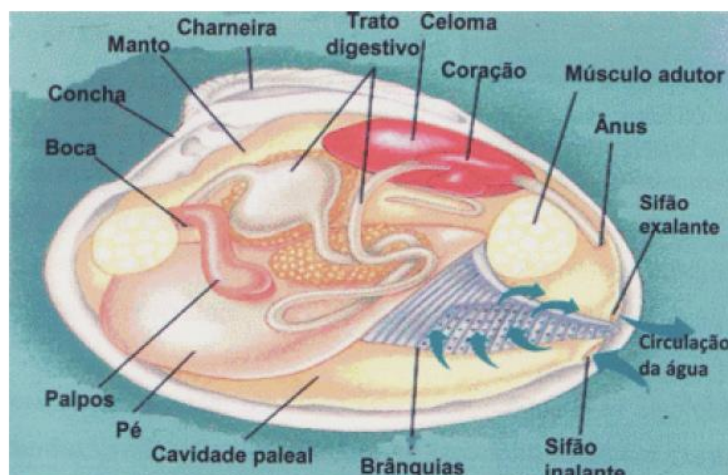
A aquacultura de moluscos contribui com um mínimo de emissões de dióxido de carbono o que aumenta o valor da aquacultura como uma importante fonte de proteína animal com menor pegada de carbono e com potencial relevante para a mitigação da libertação de carbono para a atmosfera (FAO, 2010).

1.2 Bioecologia dos Bivalves

O termo molusco bivalve designa o animal de corpo mole protegido por um exosqueleto em forma de uma concha de duas valvas, que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores (Fig.4). O corpo é constituído essencialmente por um pé e uma série de lâminas branquiais. As valvas são fechadas por retração dos músculos adutores, quando estes relaxam a concha abre automaticamente devido a um ligamento elástico. Os bivalves para respirarem e obterem alimento filtram grandes quantidades de água que entra na cavidade paleal

e banha as brânquias onde ficam retidos o fitoplâncton, outros microrganismos e as partículas orgânicas que se encontram em suspensão. (Silva, Costa & Rodrigues, 2008).

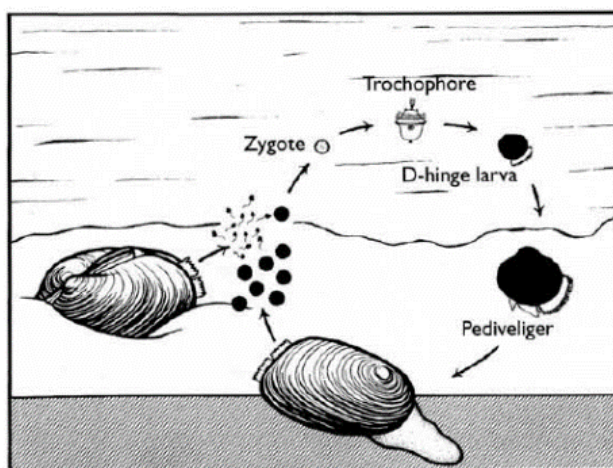
Figura 4 Esquema de um molusco bivalve.



Fonte: Silva, Costa & Rodrigues, 2008

Na maioria dos bivalves marinhos, como em muitos invertebrados marinhos, os machos expulsam o esperma para a água do mar enquanto as fêmeas expulsam os óvulos (Fig. 5), pelo que a fecundação ocorre na coluna de água (Brink, 2001). Hoje em dia através de um estímulo térmico é possível induzir a libertação dos gametas pelos bivalves em cativeiro (Matias, 2008).

Figura 5 Ciclo de vida de um bivalve.



Fonte: Brink, 2001

Após a fecundação, o zigoto desenvolve-se primeiro em larva trocófora e, em seguida, em uma larva velígera. Antes da metamorfose, o pé desenvolve-se, momento em que a larva é chamada de pedivelígera. Na metamorfose ocorre a perda do velum ciliado, o bivalve estabelece-se no fundo e começa a sua fase bentónica, como pós-larva é capaz de se fixar usando o seu pé (Brink, 2001).

Os moluscos bivalves filtradores retêm partículas pequenas da corrente de água usando as brânquias dilatadas e as adaptações especiais do mecanismo de limpeza do muco. Nas várias espécies de bivalves existem diferenças na taxa de acumulação devido às diferentes eficiências de absorção, atribuíveis à morfologia do filtro e taxas variáveis de digestão e eliminação (Bernard, 1989).

A hemolinfa desempenha um papel importante nas trocas gasosas, na osmorregulação, na distribuição de nutrientes, na eliminação de resíduos e na defesa interna (Gosling, 2004).

Os hemócitos são responsáveis pelos mecanismos de defesa celular (fagocitose, produção das espécies reativas intermediárias de oxigénio e libertação de enzimas lisossomais). A capacidade das diferentes bactérias sobreviverem à atividade microbicida da hemolinfa depende da sua sensibilidade a esses fatores combinados (Duperthuy *et al.*, 2011).

Todos os aspetos da bioecologia destes animais, incluindo a alimentação, a reprodução, o crescimento, a respiração, a osmorregulação, assim como a sanidade animal estão submetidos à influência de fatores ambientais (abióticos) e de natureza biológica (bióticos), sendo a sua distribuição determinada por ambos (Silva, Costa & Rodrigues, 2008). Consideram-se fatores abióticos: a temperatura, salinidade e profundidade da água, o tipo de substrato, a concentração de oxigénio, as correntes e a turbidez. Por sua vez, consideram-se fatores bióticos: a predação, a competição e os parasitas. Existem também outros fatores antropogénicos como os contaminantes transmitidos pela água, espécies introduzidas e doenças (Gosling, 2004).

A atividade biológica dos bivalves é afetada com a elevação da temperatura, aumentando o movimento ciliar e, conseqüentemente, a quantidade de água bombeada e o ritmo respiratório. A abertura máxima das valvas acontece por volta dos 20 °C e a atividade das brânquias é insignificante entre 3 °C e 8 °C e máxima entre 25 °C e 30 °C. A temperaturas mais altas, o animal introduz maior quantidade de água na cavidade paleal, consumindo mais alimento e oxigénio (Silva, Costa & Rodrigues, 2008). A atividade biológica também é afetada pela salinidade – baixas salinidades inibem a atividade de filtração em algumas espécies (OMS, 2010).

Quando se analisa a distribuição geográfica em grande escala a temperatura desempenha um papel mais importante do que a salinidade. Nos oceanos abertos, a salinidade varia entre 32 ppm e 38 ppm, com uma média de 35 ppm (Kalle, 1971). No entanto, as regiões costeiras e estuarinas estão sujeitas a flutuações de salinidade mais pronunciadas, devido à evaporação, precipitação e afluentes, o que faz com que a salinidade seja o fator limitante mais importante para a distribuição geográfica das espécies em pequena escala.

Os moluscos bivalves que habitam a zona intertidal estão sujeitos a períodos regulares de falta de água. Para os animais localizados nos pontos mais altos da zona intertidal, os períodos em que se encontram emersos são mais longos e, consequentemente, esses indivíduos são frequentemente submetidos a temperaturas extremas e a dessecação. Os limites de distribuição superiores para uma espécie são definidos pela sua capacidade de tolerar tais extremos através de vários mecanismos fisiológicos (Gosling, 2004).

A prevenção da dessecação durante o transporte dos bivalves vivos a seco, também foi reconhecida como um fator relevante pela indústria do setor. A dessecação pode contribuir para a mortalidade, reduzindo a eficiência respiratória, devido à desidratação das superfícies respiratórias, ou a alterações fisiológicas nas células, resultantes do aumento da concentração osmótica de fluido extracelular causada pela perda de água (Duncan, 1993).

A emersão dos bivalves pode também originar a acumulação de produtos metabólicos tóxicos finais. Os bivalves produzem amoníaco como o principal composto de produtos azotados. Em condições de imersão, a toxicidade desta substância é rapidamente reduzida por diluição à medida que os compostos amoniacais são excretados na água circundante. No entanto, quando emersos, produtos excretados tóxicos, incluindo amónia, podem acumular-se na cavidade do manto dos bivalves (Vooy & Zwann, 1978), com implicações potenciais para a sobrevivência.

Em Portugal são comercializadas várias espécies de moluscos bivalves, provenientes tanto da aquacultura como de bancos selvagens. No presente trabalho utilizaram-se as descritas seguidamente:

A amêijoa-bona, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), distribui-se desde o sul e oeste da Inglaterra até à Península Ibérica, Mediterrâneo, oeste de Marrocos e Senegal e até África Ocidental (Poppe & Goto, 1991 citado por FAO, 2017). Habita na maré inferior e sub-maré rasa, em areia, cascalho ou argila enlameada, geralmente em águas tranquilas na zona costeira, lagoas e zona litoral (Silva, Costa & Rodrigues, 2008).

A amêijoa-japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), indígena do Pacífico ocidental, foi introduzida primeiro na costa oeste da América do Norte e daqui a oeste da Europa. Encontra-se em substratos de areia ou lama, característicos de áreas com fraco fluxo de corrente. A água subjacente tende a ser turva devido ao material em suspensão de partículas insolúveis finas, inorgânicas (argila, limo, areia) ou orgânicas, e resíduos industriais ou domésticos. Na Europa, provou ser uma espécie resistente, de rápido crescimento, mas geralmente não reprodutora, com potencial substancial para produção comercial (Gosling, 2004).

O biótopo da amêijoia-macha, *Venerupis corrugata* (Gmelin, 1791), estende-se desde a zona entre marés até cerca de 40 metros de profundidade, prefere zonas abrigadas com correntes fracas ou moderadamente fortes e vive em fundos de areia, lodo ou cascalho. Distribui-se pelo mar Mediterrâneo e desde a Noruega até África do Sul (Sea Life Base, 2017).

A ameijola, *Callista chione* (Linnaeus, 1758), encontra-se distribuída por todo o mar Mediterrâneo e pela costa atlântica do sudoeste das ilhas britânicas a Marrocos, incluindo as Ilhas Canárias, da Madeira e dos Açores. Este bivalve habita em areia lodosa de 10 a 130 m de profundidade, e em algumas áreas é o filtrador proeminente das espécies bivalves em termos de biomassa (Poppe & Goto, 1993, citado por Martínez-Pita, Sánchez-Lazo, Prieto & Moreno, 2011). Foi relatado (Charles *et al.*, 1999, citado por Metaxatos, 2004) que *C. chione*ingere microalgas a uma taxa 5 a 6 vezes maior que as bactérias e que as bactérias livres provavelmente cobrem apenas uma pequena parte dos seus requisitos energéticos.

A conquilha, *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758), habita entre a marca da maré baixa e 20 m de profundidade, em fundos arenosos. Distribui-se no litoral europeu atlântico e no Mediterrâneo (Silva, Costa & Rodrigues, 2008).

O longueirão, *Ensis* sp., é encontrado desde o sul da Noruega até África do Norte, incluindo o Mediterrâneo. Tem como habitat substratos arenosos nos limites inferiores da maré até cerca de 40 m de profundidade (Tuck, 2000).

O mexilhão representa uma componente dominante das comunidades rochosas nas águas mais frias dos hemisférios norte e sul. O mexilhão azul, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), é a espécie deste género com maior distribuição, sendo encontrada de regiões subtropicais leves ao Ártico, desde regiões estuarinas a condições totalmente marinhas e de praias abrigadas e expostas a altas ondas (Gosling, 2004). *M. edulis* tem uma tolerância à salinidade entre 4 e 40 ppm (Bayne, 1976).

A ostra gigante, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), é nativa da região do Pacífico Ocidental, mas por causa das introduções bem-sucedidas na costa do Pacífico da América do Norte, Europa Ocidental e Austrália, possui uma distribuição global. *C. gigas* é comumente encontrada em estuários protegidos e rasos, tolera baixas salinidades (23-28 ppm) e prefere os fundos de rocha dura, concha ou areia, não se instalando em fundos lamacentos (Gosling, 2004).

Atualmente existem várias ameaças para o desenvolvimento da aquacultura. Destacam-se as alterações climáticas, que causam um efeito indireto na propagação e ocorrência de doenças em organismos aquáticos e modificações na distribuição de agentes patogénicos para os animais marinhos. Por exemplo, a vibriose é uma doença cuja ocorrência pode aumentar devido às

alterações climáticas, uma vez que as espécies *Vibrio* crescem preferencialmente em águas quentes ($> 15\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com baixa salinidade ($< 25\text{ ppm}$). No entanto, a aquacultura global é conduzida em grande parte por pequenos e médios aquicultores com capacidade limitada para controlar as condições dos sistemas de criação (FAO, 2016). Adicionalmente, a existência de vários poluentes na água, exercem efeitos adversos sobre a imunidade, afetando a resistência às infecções, o que influencia a sobrevivência dos bivalves (Gosling, 2004). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), que entram no meio marinho a partir de uma variedade de fontes industriais, inibem a fagocitose em hemócitos de *M. edulis* e a estabilidade da membrana dos lisosomas, que desempenham um papel central na degradação do material fagocitado, é interrompida (Grundy, Ratcliffe & Moore, 1996). Outros poluentes, como o petróleo bruto, reduzem a produção de espécies reativas intermédias de oxigénio (ROS) pelos hemócitos (Gosling, 2004).

1.3 Qualidade Microbiológica

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves vivos está diretamente relacionada com a qualidade das águas onde ocorrem (Pedro, Castilho & Silva, 2008b). Dependendo do seu habitat, os moluscos bivalves podem apresentar microrganismos aquáticos comensais e/ou bactérias e vírus patogénicos humanos. Regra geral, os moluscos bivalves contêm uma população bacteriana residente, cujo teor varia entre a 10^4 e 10^6 unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de carne e líquido intravalvar. Se a temperatura da água for baixa e esta não se encontrar poluída, os teores bacterianos podem ser baixos ($\leq 10^3$ UFC/g de carne e líquido intravalvar); no entanto, as cargas microbianas dos bivalves podem ser bastante elevadas, caso as águas conquícolas se encontrem poluídas e com temperaturas elevadas, (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1986).

Dado que os ensaios microbiológicos clássicos, utilizados para a deteção de bactérias patogénicas são, em geral, caros, morosos e exigentes quanto à mão-de-obra especializada, frequentemente, recorre-se à enumeração de grupos de microrganismos indicadores, que fornecem informação sobre a probabilidade da eventual presença de agentes patogénicos no género alimentício. Para eliminar a ambiguidade no termo "indicador microbiano", são agora reconhecidos três grupos (Ashbolt, Grabow & Snozzi, 2001):

- Indicador de processo – grupo de organismos que demonstra a eficácia de um processo, como bactérias heterotróficas totais ou coliformes totais para desinfeção de cloro;
- Indicador fecal – grupo de organismos que indica a presença de contaminação fecal, como os grupos bacterianos de coliformes termotolerantes ou *E. coli*;

- Organismos de índice e modelo – grupo ou espécie indicativa de presença e comportamento de patogênicos, respectivamente, como *E. coli* como indicadora de salmonela e colifagos de F-RNA como modelos de vírus entéricos humanos.

A validade de qualquer sistema de indicadores também é afetada pelas taxas relativas de remoção e destruição do indicador versus o organismo alvo, as diferenças devido a resistência ambiental ou mesmo a capacidade de se multiplicar no meio ambiente influenciam a sua utilidade (Ashbolt *et al.*, 2001).

O tempo necessário para realizar testes para organismos indicadores estimulou a pesquisa em métodos mais confiáveis e mais rápidos. Um resultado dessas pesquisas é o uso de compostos cromogênicos, que podem ser adicionados aos meios convencionais utilizados para o isolamento das bactérias indicadoras, essas substâncias cromogênicas são modificadas por enzimas (que são típicas para as bactérias respectivas) ou por metabolitos bacterianos específicos. A substância cromogênica altera a sua cor, possibilitando assim uma fácil detecção das colônias que exibem a capacidade metabólica, desta forma, estas substâncias podem ser utilizadas para evitar a necessidade de isolamento de culturas puras e testes de confirmação. O tempo necessário para a determinação de diferentes bactérias indicadoras pode ser reduzido entre 14 a 18 horas (Ashbolt *et al.*, 2001).

As características de alguns indicadores analisados neste trabalho são (Ashbolt *et al.*, 2001):

- Coliformes totais: pertencem à família *Enterobacteriaceae* e definem-se como bactérias com forma de bacilos, gram-negativas, não esporuladas, oxidase negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, que fermentam lactose (através da enzima β -galactosidase) com produção de ácido e gás no período de 24-48 h a 36 ± 2 °C. Não são indicadores específicos de contaminação fecal.
- Coliformes fecais ou termotolerantes: definem-se como bactérias coliformes que produzem ácido e gás a partir da fermentação da lactose à temperatura de 44.5 ± 0.2 °C em 24 ± 2 h. São específicos do intestino e matérias fecais de animais homeotérmicos. Atualmente, sabe-se que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais, os dois últimos incluem estirpes de origem não fecal.
- *Escherichia coli*: bactérias coliformes termotolerantes que produzem indol a partir de triptofano. Caracterizam-se também por produzirem β -glucuronidase, cresce em meio complexo a 44-45° C e fermenta a lactose com produção de ácido e gás. É o organismo

mais adequado como indicador de contaminação fecal com origem em animais homeotérmicos.

- **Estreptococos fecais:** bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas, não esporuladas, catalase-negativas que crescem em meio seletivo com azide dextrose a 45 °C. São provenientes de fezes de animais homeotérmicos, sendo relativamente específicos como indicadores de contaminação fecal.
- **Clostrídios sulfito-redutores:** bactérias com forma de bacilo, gram-positivas, formadoras de esporos, não móveis, anaeróbias obrigatórias. São organismos capazes de reduzir o sulfito, e devido à precipitação do sulfureto de ferro ocorre o enegrecimento do meio de cultura à sua volta permitindo, assim, identificar facilmente a sua presença. Esta espécie pode ser encontrada no solo, na água e nos sedimentos aquáticos, podendo também ser isolada a partir do conteúdo intestinal de vertebrados e de invertebrados.
- **Microrganismos aeróbios totais:** representam o número de bactérias (expressos em unidades formadoras de colónias, UFC, por grama) presentes num produto alimentar e obtidas em condições ótimas de cultura, não sendo uma medida da população bacteriana total, mas apenas uma medida da fração da microflora capaz de produzir colónias no meio de cultura usado nas condições de incubação. Estas contagens são úteis, por exemplo, para avaliar as condições da matéria-prima, a eficiência dos procedimentos, e as condições de armazenagem/transporte (Huss, 1997a);
- **Família das pseudomonas:** bactérias gram-negativas, oxidase positivas e aeróbias obrigatórias. Tem como habitat natural o solo, a água e superfícies em contacto com o solo ou a água (Todar, 2005).
- **Família dos vibrio:** composta por bactérias gram-negativas, oxidase positivas, anaeróbias facultativas e móveis. O seu crescimento é favorecido pela presença de cloreto de sódio. Tem como habitat natural a água das zonas costeiras ou estuarinas (OMS, 2008).

É, geralmente, aceite que os coliformes fecais, ou em particular a *E. coli*, indicam um risco de contaminação por patogénicos entéricos, como é o caso da *Salmonella*. Contudo, parece não existir uma relação entre a presença de bactérias pertencentes aos géneros *Listeria* ou *Vibrio* com o grupo dos indicadores fecais, o mesmo acontecendo entre o teor de bactérias fecais e a presença de vírus entéricos (Savichtcheva & Satoshi, 2006).

Dado que nenhum grupo indicador satisfaz, por si só, simultaneamente todas as condições desejadas e por isso nenhum pode ser considerado como indicador universal da presença dos

organismos patogénicos, deve-se recorrer a um conjunto de indicadores que apresentem a melhor correlação com os riscos de saúde associados com a contaminação de um determinado género alimentício, como é o caso dos moluscos bivalves vivos (Ashbolt *et al.*, 2001).

1.4 Classificação e Monitorização Microbiológica das Zonas de Produção

Certos géneros alimentícios podem apresentar determinados riscos para a saúde humana que tornem necessário o estabelecimento de regras específicas de higiene. É esse o caso dos géneros alimentícios de origem animal, como os moluscos bivalves vivos. Tendo em vista a salvaguarda da saúde dos consumidores, foram publicados vários diplomas legais, a nível europeu e nacional com o estabelecimento de regras para a exploração e salubridade dos moluscos bivalves, sendo de destacar os Regulamentos da Comissão Europeia n^{os} 852, 853 e 854, de 29 de Abril de 2004.

“Para minimizar os riscos para a saúde pública nos vários Estados-Membros da União Europeia, as zonas de produção em que a colheita de moluscos bivalves vivos está autorizada devem ser controladas quanto à sua qualidade microbiológica e classificadas em diferentes estatutos sanitários pela autoridade competente. De acordo com o nível de contaminação fecal observado ao longo do tempo, as zonas são classificadas em três categorias (A, B e C), por ordem crescente de risco de contaminação dos bivalves por patogénicos, que determinam o destino e tratamento posterior dos mesmos” (Pedro, 2007, p. 161).

Devido à variação temporal na concentração de bactérias indicadoras de contaminação fecal e ao facto da presença de agentes patogénicos geralmente não estar relacionada com concentração destas em amostras únicas (Lees 2000), a classificação das zonas de produção de moluscos bivalves é normalmente baseada numa avaliação dos dados ao longo de um período de tempo. Assim, a classificação microbiológica baseia-se em dados históricos (OMS, 2010).

O Reg. (CE) n^o 854/2004 estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. No anexo II determina que os Estados-Membros devem assegurar que a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos sejam submetidas a controlos oficiais e que a autoridade competente classifique as zonas de produção em que autoriza a colheita em três categorias diferentes em função do nível de contaminação fecal, nomeadamente no teor de *E. coli* por 100 g de carne e líquido intravalvar. O método de referência para a análise da concentração de *E. coli* é o teste do número mais provável (NMP) de 5 tubos e 3 diluições especificado na norma ISO 16649-3 (2015).

De acordo com os regulamentos da União Europeia, a autoridade competente deve estabelecer um programa de amostragem de moluscos bivalves vivos na zona de produção, com base no

exame dos dados obtidos e com um número de amostras, uma distribuição geográfica dos pontos de colheita de amostras e uma frequência de amostragem que assegurem que os resultados da análise sejam tão representativos quanto possível para a zona em questão, tendo em vista classificar uma zona de produção ou de afinação.

Estes planos de amostragem, para o controlo da qualidade microbiológica dos moluscos bivalves vivos, devem ter em especial atenção: (i) as variações prováveis da contaminação fecal; (ii) as fontes de poluição de origem humana ou animal que possam constituir uma fonte de contaminação para a zona de produção; (iii) as quantidades de poluentes orgânicos lançadas nessa zona durante os diferentes períodos do ano (em função das variações sazonais das populações humana e animal na bacia hidrográfica, das precipitações, do tratamento das águas residuais); e (iv) as características da circulação de poluentes com base no regime de correntes, na batimetria e no ciclo das marés na zona de produção (Reg. n° 854/2004).

A contaminação fecal pode ser originária de uma variedade de fontes, incluindo descargas de esgoto (contínuas ou descontínuas), animais de produção, vida selvagem e transporte marítimo. O impacto será afetado pela capacidade de diluição da fonte de contaminação na água recetora e pela forma como as correntes arrastam a contaminação para as zonas de apanha de moluscos bivalves. As fontes de contaminação numa área podem mudar com o tempo, devido à implementação de esquemas de melhoria de esgoto ou mudanças nas práticas agrícolas (Anon, 2017).

A autoridade competente, de acordo com o Reg. (CE) n° 854/2004, classifica como pertencendo à Classe A as zonas onde os moluscos bivalves vivos podem ser colhidos para consumo humano direto. Os bivalves provenientes dessas zonas devem cumprir as regras sanitárias fixadas e, quanto à contaminação fecal, não devem exceder, em 80 % das amostras recolhidas durante o período de revisão, 230 *E. coli* por 100 g de tecido muscular e líquido intravalvar, não podendo nenhuma amostra apresentar teores superiores a 700 *E. coli*/100 g (Reg. n° 853/2004; Reg. n° 854/2004; Reg. n° 2285/2015).

São classificadas como pertencendo à Classe B, as zonas a partir das quais os moluscos bivalves vivos podem ser colhidos e colocados no mercado para consumo humano unicamente após tratamento num centro de depuração ou após afinação, de modo a cumprir as regras sanitárias. Os bivalves provenientes dessas zonas não devem exceder, em 90 % das amostras, 4600 *E. coli*/100 g, não podendo nenhuma amostra, apresentar teores superiores a 46000 *E. coli*/100 g.

Os moluscos bivalves vivos provenientes de zonas classificadas como C não devem exceder 46 000 *E. coli*/100 g, e devem passar por um período de afinação prolongado ou serem transformados. Zonas onde o limite de 46 000 *E. coli*/100 g é excedido a apanha é proibida.

Sempre que os resultados da monitorização desrespeitarem as regras sanitárias aplicáveis aos bivalves, ou haja a hipótese de risco para a saúde humana, a autoridade competente deve interditar a zona de produção em causa. Contudo, pode reclassificar temporariamente uma zona de produção numa classe sanitária indicadora de maior contaminação (por exemplo reclassificar uma zona A como sendo da classe B, da classe C ou proibida), se satisfizer os critérios pertinentes estabelecidos e não apresentar outros riscos para a saúde humana (CEFAS, 2017).

Geralmente, aceita-se uma frequência mensal para a monitorização de *E. coli* nos moluscos bivalves vivos, com análise anual do histórico de resultados, recorrendo habitualmente a séries temporais referentes a três anos, que contenham pelo menos 24 resultados (CEFAS, 2017). Dado que podem ser observadas diferenças nos resultados entre os anos secos e húmidos, um período de revisão de longo prazo pode ajudar a reduzir essa variação. Há também a necessidade de rever os dados quando há uma mudança conhecida de entradas de contaminantes para uma área de colheita, certos eventos de contaminação considerados improváveis de se repetir podem ser ignorados ao considerar a classificação de longo prazo de uma área (OMS, 2010).

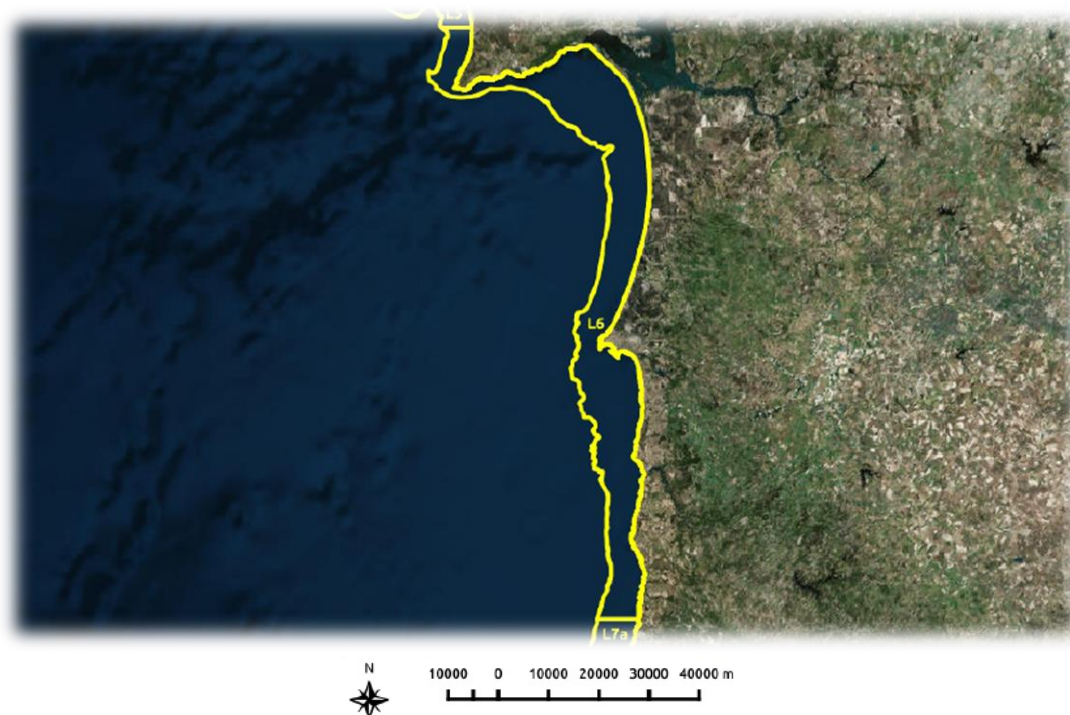
A Portaria n.º 1421/2006 estabelece que o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.) é a autoridade competente que classifica as zonas de produção de moluscos bivalves vivos e periodicamente por despacho publica a classificação. O IPMA monitoriza as zonas de produção, estabelece os planos de amostragem e determina, de acordo com os resultados da monitorização efetuada, a interdição de apanha e comercialização, comunicando também o início e o fim da interdição.

No Despacho n.º 1851/2017 o Conselho Diretivo do IPMA atualizou a classificação das zonas de produção de moluscos bivalves vivos em Portugal continental.

A nível nacional, as zonas de produção de moluscos bivalves distribuem-se por regiões litorais, de estuário e lagunares. Os locais mais próximos de urbanizações, como acontece com as zonas de produção dos estuários têm teores de contaminação mais elevados, tal como acontece nos sistemas lagunares, devido à reduzida circulação da água. As zonas estuário-lagunares estão maioritariamente classificadas como B ou C, estando ainda algumas consideradas proibidas. As zonas litorais estão maioritariamente classificadas como A, com algumas espécies classificadas como B, tendo em conta a circulação da água e a capacidade de diluição (Despacho n.º 1851/2017).

A zona litoral de Setúbal - Sines designada por L6, compreendida entre os paralelos 38.52222N e 37.45167N (a norte da foz da ribeira de Seixe) e entre a costa, incluindo a zona intertidal e a batimétrica dos 70 metros (Despacho nº 1851/2017), como se observa na Fig.6, encontram-se bancos naturais das seguintes espécies: amêijoia-branca (*Spisula solida*), ameijola (*Callista chione*), conquilha (*Donax trunculus*), lapa (*Patella* spp.), longueirão (*Ensis* spp.) e mexilhão (*Mytilus edulis*), encontrando-se ocasionalmente pé-de-burrinho (*Chamelea galina*) e pé-de-burrico (*Venus casina*) (IPMA, 2017b).

Figura 6 Litoral Setúbal – Sines, Portugal (L6)



Fonte: Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2017a)

Num estudo realizado por Gaspar, Moura e Pereira (2015), constatou-se que as espécies mais representativas em termos de número de indivíduos capturados por arrasto, nesta zona litoral, foram o longueirão (7026 ind.) e a amêijoia-branca (4011 ind.) enquanto em biomassa, a espécie comercial mais representada foi o longueirão (61,5 kg) seguida da ameijola (43,8 kg). Estes autores observaram também que a ameijola habita em profundidades de 12, 18, 20 e 25 m, e a maioria dos seus indivíduos habitam a 25 m de profundidade; a conquilha situa-se entre os 3 e 20 m de profundidade, sendo encontrada em maiores quantidades aos 4 m de profundidade; o longueirão encontra-se entre os 3 e 13 m de profundidade, estando em maior quantidade entre as batimétricas dos 6 e 11 m.

De acordo com o Despacho nº 1851/2017, que estabelece a classificação das zonas de produção de moluscos bivalves, apesar de a zona ser a mesma, a ameijola e a conquilha têm classificação A enquanto o longueirão tem classificação B.

Para a realização da avaliação do efeito temporal e da espécie na qualidade microbiológica dos bivalves vivos, foram utilizadas três espécies desta zona de produção, nomeadamente a ameijola, a conculha e o longueirão.

Os resultados obtidos num programa de monitorização microbiológica e a classificação resultante dependem da conceção e implementação do programa. Os três principais fatores que afetam os resultados são a amostra que é tomada, a localização dos pontos de amostragem e a frequência de amostragem (OMS, 2010). Os planos de amostragem para o controlo da qualidade microbiológica dos moluscos bivalves vivos devem ter em especial atenção as variações prováveis da contaminação fecal (Reg. nº 854/2004).

Beliaeff e Cochard (1995) realizaram um estudo detalhado da variação espacial da contaminação fecal numa área de cultivo de mexilhões franceses (dimensões aproximadas de 6,5 Km e 0,9 Km) em duas ocasiões de amostragem separadas. Eles encontraram variações significativas nas concentrações de coliformes fecais em toda a área concluindo que as tentativas de obter uma imagem geral da contaminação espacial em uma zona podem ser proibitivas em termos de custo e sugeriram que uma solução prática seria restringir a amostragem para os pontos que representam o maior nível de contaminação fecal.

O efeito do momento de amostragem nas concentrações de *E. coli* é influenciado por fatores biológicos, diferentes espécies de bivalves podem variar acentuadamente nos níveis de contaminação por *E. coli* quando são expostos à mesma qualidade de água, como já foi referido. Eles também diferem no tempo de resposta (absorção e remoção) para eventos específicos de contaminação. A recomendação padrão é, portanto, que cada espécie comercialmente colhida dentro de uma área seja monitorizada separadamente para que o estatuto de classificação correto seja dado para essa espécie e, portanto, que os requisitos corretos de tratamento pós-colheita sejam aplicados (CEFAS, 2017).

O uso de espécies indicadoras reduz o número de amostras que precisam ser tomadas numa área, no entanto, se uma ou mais espécies indicadoras forem usadas, deve-se tomar uma abordagem conservadora para proteger a saúde pública. Isto significa que as espécies indicadoras devem produzir resultados pelo menos tão altos quanto os das outras espécies para as quais atua como indicador (CEFAS, 2017).

A amostragem pode ser aleatória ou direcionada, sendo que a aleatória destina-se a refletir o estado geral de contaminação de uma área, enquanto a amostragem direcionada se destina a concentrar-se nas condições suscetíveis de produzir os resultados mais elevados. Ambas as abordagens podem ser difíceis de implementar na prática, para a amostragem direcionada deve

ser realizada uma análise detalhada em relação aos vários fatores ambientais que podem afetar os resultados e podem não estar disponíveis dados suficientes. Na União Europeia, nenhuma das abordagens é explicitamente identificada na diretiva, mas geralmente supõe-se que a amostragem é direcionada (OMS, 2010).

O local e o tipo de amostra derivam do plano de amostragem, como também o momento de amostragem. Para os moluscos bivalves, é vantajoso, sempre que possível, amostrar usando os meios normalmente utilizados para a apanha e/ou captura comerciais, pois podem ser introduzidas contaminações adicionais durante alguns procedimentos de dragagem (OMS, 2010).

As amostras devem ser tomadas a montante de qualquer potencial distúrbio (como o amostrador) e de forma a evitar a suspensão do sedimento. Depois dos bivalves serem removidos da água e fechados, qualquer lama e sedimento aderido a eles devem ser retirados, não se deve reimmergir totalmente os moluscos na água, pois isso pode fazer com que eles se abram e permita a drenagem (CEFAS, 2017).

Cada amostra deve ser colocada em separado num saco de plástico intacto com um rótulo impermeável para garantir a rastreabilidade. Os sacos apropriados protegem da contaminação, evitando que ocorra contaminação cruzada com outras amostras e dos recipientes de transporte (CEFAS, 2017).

Os critérios de transporte de amostras devem estar em conformidade com a norma ISO 6887-3 (2017), que indica:

À chegada ao laboratório, a temperatura interna do ar do recipiente de trânsito deve ser registrada. Para amostras em que tenham decorrido mais de 4 horas entre a recolha da área de produção e o recebimento, a temperatura interna do ar deve estar entre 0 °C e 10 °C. Para as amostras que tenham decorrido menos de 4 horas a temperatura interna do ar deve ser inferior à temperatura registada no momento da amostragem. As porções de teste devem ser armazenadas a $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e devem ser processadas dentro de 24 horas após a colheita.

É importante que a concentração de *E. coli* nos moluscos recebidos pelo laboratório de testes reflita aquelas que existiam no momento da amostragem. O desenvolvimento e a mortalidade de microrganismos nos géneros alimentícios estão relacionados com a temperatura e o tempo decorrido entre a amostragem e o processamento da amostra, portanto os protocolos de amostragem especificam uma temperatura inferior a 10 °C (sem congelamento) para o

transporte e um tempo máximo entre a amostragem e o início da análise de 24 horas (CEFAS, 2017).

Cook e Ruple (1989) relataram que não foram observadas alterações nas concentrações de coliformes fecais e de *E. coli* em ostras (*Crassostrea virginica*) armazenadas a 10 °C, enquanto o armazenamento a 22 °C produziu um aumento da concentração em ambos os indicadores em 3 dias. Experiências iniciais realizadas no Reino Unido com vista à definição de protocolos para a amostragem, mostraram que não existe efeito significativo na concentração de *E. coli* quando a amostra é armazenada a 4 °C, 10 °C ou 13 °C até 72 h (Lart & Hudson, 1993). O efeito do armazenamento a 19-22 °C diferiu entre três espécies: numa espécie de mexilhão não apresentou alterações, noutra espécie de mexilhão a *E. coli* apresentou um desenvolvimento significativo em 48 horas. Por sua vez, nas ostras apresentou algum declínio. Experiências subsequentes realizadas mostraram que houve uma tendência geral para que os níveis de *E. coli* diminuíssem no armazenamento a 2-8 °C até 72 horas (Cefas, 2006).

Atualmente, os dados disponíveis indicam que os teores de *E. coli* não aumentam significativamente em mexilhões (*M. edulis*) ou ostras gigantes (*C. gigas*) transportadas a temperaturas inferiores ou iguais a 15 °C em 48 horas. Devem ser realizados estudos de verificação para apoiar o uso de temperaturas de transporte e armazenamento fora dos intervalos dados na norma ISO 6887-3. As autoridades competentes devem empreender ou iniciar tais estudos de verificação e devem aprovar quaisquer requisitos de transporte e armazenamento de amostras com base no resultado destes (CEFAS, 2017).

1.5 Depuração, Afinação e Transformação

O Reg. (CE) nº 853/2004 estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, sendo que no capítulo dois, específico para os moluscos bivalves vivos, refere os requisitos gerais para sua colocação no mercado, como o que deve constar na documentação, requisitos aplicáveis às zonas de produção e apanha, e requisitos aplicáveis à afinação e aos centros de depuradoras e de expedição.

Relativamente ao transporte, a legislação apenas refere que “Os operadores que transportam moluscos bivalves vivos, incluindo equinodermes, gastrópodes marinhos e tunicados, devem assegurar que estes são mantidos a uma temperatura que não seja prejudicial à sua segurança ou viabilidade”. De facto, muitos retalhistas apresentam como critério para a aceitação dos bivalves vivos a respetiva viabilidade e frescura, não exigindo requisitos de temperatura à chegada da matéria-prima. Não obstante, num entreposto nacional de pescado fresco, foi observado entre outubro de 2011 e janeiro de 2012, que os valores de temperatura dos moluscos

bivalves à chegada ao cais de receção variavam entre 5 e 12,8 °C, com um valor médio de 7,9 °C (Félix, 2012).

Os moluscos bivalves vivos das zonas de produção da classe B ou C só podem ser comercializados após depuração ou afinação e devem cumprir todos os requisitos sanitários. Os moluscos bivalves vivos de tais zonas que não tenham sido sujeitos a depuração ou afinação podem ser enviados para um centro de transformação.

Depuração

Depuração (purificação) é um processo onde os moluscos bivalves vivos são mantidos em tanques de água do mar esterilizada em condições que maximizam a atividade de filtração natural, o que resulta na expulsão de conteúdo intestinal, durante o tempo necessário para reduzir a contaminação de forma a torná-los próprios para consumo humano (Reg. n° 853/2004).

A depuração foi desenvolvida originalmente como um dos vários meios para enfrentar o problema de focos de doença associados ao consumo de bivalves, como foi o surto de febre tifoide, no final do século XIX e início do século XX (Lee, Lovatelli & Ababouch, 2008).

Figura 7 Centro de depuração.



Fonte: Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos, 2017.

A depuração é eficaz na remoção de muitos contaminantes bacterianos fecais dos bivalves, mas não é consistente na remoção de outros contaminantes, como vibrios marinhos de ocorrência natural, vírus, biotoxinas marinhas, metais pesados ou produtos químicos orgânicos (Lee *et al*, 2008).

Em geral, todas as espécies de moluscos bivalves podem ser submetidas à depuração para remover os microrganismos. Os mais amplamente submetidos ao processo incluem ostras,

mexilhões e amêijoas. Algumas espécies, como berbigões, vieiras e longueirões, representam desafios específicos para a depuração, por exemplo, a mobilidade de vieiras torna difícil contê-las em cestos e evitar que agitem detritos sedimentados. Embora a depuração possa ser a única estratégia de mitigação para as espécies comidas cruas, como ostras, muitas outras espécies de bivalves são apenas levemente cozinhadas e a depuração proporcionará uma proteção adicional (Lee *et al*, 2008).

Uma vez colocado no sistema, as condições fisiológicas devem ser de modo a maximizar a atividade dos animais. Existem limites superiores e inferiores absolutos fora dos quais os bivalves não operam adequadamente, estes limites variam consoante as espécies e a origem. Os requisitos fisiológicos da mesma espécie variam acentuadamente com a região e a localização específica (por exemplo, em relação à salinidade). Os critérios que são relevantes para que a depuração seja eficaz e seja mantida a viabilidade dos indivíduos são (Lee *et al*, 2008):

- Retoma da atividade de filtração para que os contaminantes sejam expulsos
 - Manutenção das condições corretas de salinidade, temperatura e oxigénio dissolvido;
- A remoção de contaminantes
 - Por deposição e/ou remoção por circulação de água;
 - Por aplicação de condições de depuração corretas por um período de tempo adequado;
- Evitar que voltem a ser contaminados
 - Por operação de um sistema *all-in / all-out* de lote;
 - Pelo uso de água do mar limpa em todos os estágios de depuração;
 - Evitando que os detritos depositados voltem a ficar em suspensão;
 - Limpeza do sistema entre lotes;
- Manutenção de viabilidade e qualidade
 - Por manipulação correta antes, durante e após a depuração, evitando impactos por queda ou carga excessiva, períodos longos fora de água e temperaturas incorretas no transporte.

Nos sistemas de depuração de bivalves utilizados pela indústria, a esterilização da água é efetuada com recurso as radiações ultravioletas, ozono ou cloro. O processo da depuração só se inicia quando os bivalves estão imersos à temperatura adequada, é necessário um período mínimo de 42 horas de forma a permitir que os bivalves se adaptem e recuperem a atividade de filtração. Há muitos cuidados a ter durante a depuração, como separar lotes de diferentes espécies, bem como de zonas com diferentes níveis de contaminação, de forma a assegurar as

necessidades de depuração de cada espécie e proveniência, como a salinidade, a temperatura, o tempo e o oxigénio dissolvido (Cachola & Silva, 2008). “Se o sistema de depuração estiver a funcionar corretamente é possível reduzir os teores de *Escherichia coli* de inferiores ou iguais a 4600 NMP para teores inferiores a 80 NMP por 100 gramas de carne e líquido intravalvar, em 42 horas” (Pedro, Cachola & Nunes, 2008a).

A depuração é um processo complexo que envolve uma série de variáveis interativas que afetam a atividade dos bivalves. Embora garanta uma melhoria da qualidade microbiológica e do valor económico, causa *stress* fisiológico e traumático indutor de perdas significativas e alterações na composição nutricional do produto final. Esta questão tem sido discutida na indústria como uma desvantagem do método. Longos períodos de depuração dos bivalves estão associados à perda de uma percentagem considerável do índice corporal e das reservas lipídicas, o que se traduz numa diminuição da qualidade nutricional. Os valores de condição corporal ao longo de 72 horas de depuração mostram uma diminuição considerável em todas as espécies estudadas, como consequência da inanição imposta pela depuração (Ruano, Ramos, Quaresma, Bandarra & Fonseca, 2012).

Afinação

Afinação é a transferência de moluscos bivalves vivos para zonas marinhas, lagunares ou estuarinas classificadas como classe A durante o tempo necessário para a eliminação dos contaminantes. A zona de afinação tem de estar claramente delimitada por boias, postes ou quaisquer outros meios fixos e só pode ser utilizada exclusivamente para a depuração natural de moluscos bivalves vivos, e tem de ser aprovada pela autoridade competente (Reg. nº 853/2004). Atualmente, não existe nenhuma zona de afinação em Portugal.

As condições de afinação devem assegurar condições ótimas de depuração como: utilizar técnicas de manuseamento dos bivalves que permitam o reinício da alimentação por filtração após imersão em águas naturais; usar uma densidade de bivalves que não impeça a depuração; imergir os bivalves durante um período adequado, fixado em função da temperatura da água, que deve ter pelo menos a duração de dois meses, e assegurar uma separação dos locais dentro da mesma zona de afinação suficiente para evitar a mistura dos lotes (Reg. nº 853/2004).

Transformação

Os moluscos bivalves vivos provenientes de zonas com classe B ou C, que não tenham sido sujeitos a depuração ou afinação, são enviados para um centro de transformação onde deverão ser submetidos a um tratamento destinado a eliminar os microrganismos patogénicos. Os

tratamentos autorizados são a esterilização em recipientes hermeticamente fechados e tratamentos térmicos que envolvam (Reg. nº 853/2004):

- Imersão em água a ferver durante o tempo necessário para que a temperatura interna da carne dos moluscos atinja, no mínimo 90 °C e mantenha essa temperatura durante um período mínimo de 90 segundos;
- Cozedura durante 3 a 5 minutos num recipiente fechado em que a temperatura esteja compreendida entre 120 °C e 160 °C e em que a pressão esteja compreendida entre 2 e 5 kg/cm², seguida da retirada das conchas e da congelação da carne até esta atingir uma temperatura interna de - 20 °C,
- Cozedura a vapor sob pressão em recipiente fechado que satisfaça os requisitos relativos ao tempo de cozedura e à temperatura interna da carne dos moluscos.

2. Materiais e Métodos

No presente capítulo apresentam-se os materiais e as metodologias utilizados no ensaio I em que se simularam condições de armazenamento/transporte a 1 e 10 °C durante 24 e 48 h, assim como as usadas no ensaio II em que se avaliou a variação da qualidade microbiológica em três espécies de bivalves provenientes da mesma zona de produção durante três estações do ano, nomeadamente, inverno, primavera e verão. Todas as amostras foram constituídas por 10 a 25 indivíduos, tendo sido transportadas para o laboratório a cerca de 4 °C, sendo analisadas num período inferior a 24 horas após a amostragem.

2.1 Materiais

Ensaio I

Foram estudadas entre março e julho do ano de 2017, sete espécies de bivalves (Fig. 8), colhidas em triplicado, nomeadamente:

- ameijola (*Callista chione*), conculha (*Donax trunculus*), longueirão (*Ensis* sp.), mexilhão (*Mytilus edulis*), provenientes de zonas litorais;
- amêijoia-ba (*Ruditapes decussatus*), amêijoia-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), amêijoia-macha (*Venerupis corrugata*), e ostra (*Crassostrea gigas*), provenientes de zonas estuarinas lagunares.

As amostras foram colhidas em pontos de amostragem utilizados pelo IPMA para a monitorização das zonas de produção, e seleccionaram-se espécies provenientes de zonas em que o transporte das amostras até ao laboratório fosse inferior a 4 horas e a temperatura de chegada fosse inferior à temperatura da água da zona de produção.

As amostras, constituídas por cinco subunidades, foram agrupadas do seguinte modo: o primeiro grupo foi ensaiado à chegada ao laboratório; o segundo grupo foi armazenado a 1 ± 1 °C durante 24 h; o terceiro grupo foi armazenado a 10 ± 1 °C durante 24 h; o quarto grupo foi armazenado a 1 ± 1 °C durante 48 h e o quinto grupo foi armazenado a 10 ± 1 °C durante 48 h.

Figura 8 Imagens das espécies de bivalves ensaiadas.



Da direita para a esquerda temos: amêijoa-boá, amêijoa-japonesa, amêijoa-macha, ameijola, conquilha, longueirão, mexilhão e ostra.

Ensaio II

Foram avaliadas três espécies de bivalves (Fig. 8), nomeadamente, ameijola, conquilha e longueirão, provenientes da zona de produção do litoral Setúbal-Sines (L6), mais precisamente da Comporta, colhidas no mesmo dia. Os bivalves foram colhidos durante três estações do ano, inverno (janeiro), primavera (abril) e verão (junho).

Preparação da amostra e diluições decimais

Após a receção da amostra e verificação da viabilidade realizou-se a sua preparação de acordo com a ISO 6887-3 (2017). Procedeu-se à lavagem das conchas em água corrente e à abertura e recolha da carne e líquido intervalvar dos bivalves em condições de assepsia (Fig. 9).

De seguida, pesou-se, numa balança com tara automática (PJ3000 Mettler) 25 g de bivalve e líquido intervalvar mais 225 g de Maximum Recovery Diluent (MRD, Oxoid LTP, Basingstoke, Hampshire, England) para um saco Stomacher (Seward) e onde foi homogeneizado durante um minuto num Stomacher 400 Circulator (Seward), obtendo-se assim a suspensão-mãe (diluição 10^{-1}). Posteriormente efetuaram-se as diluições decimais adicionando 1 ml da suspensão anterior a 9 ml de MRD.

Figura 9 Abertura da amostra em assepsia.



Nas amostras destinadas ao ensaio de vibrio foi efetuada nova pesagem de 25 g, sendo o MRD substituído por água peptonada alcalina (APW). A APW foi preparada com cloreto de sódio (Merck) e peptona bacteriológica (Oxoid), na proporção de 10 g de cada um dos elementos para um litro de água. Acertou-se o pH a 8,5. Após autoclavagem a 121° C, durante 15 minutos, verificou-se o pH final, de acordo com procedimento interno do IPMA (Procedimento Técnico Auxiliar de Laboratório, PTAL 10).

2.2 Parâmetros Microbiológicos

Ensaio I

Neste ensaio foram avaliados três parâmetros microbiológicos nas amostras de bivalves, nomeadamente, a contagem de microrganismos viáveis totais e a quantificação de coliformes e de *E. coli*.

Ensaio II

No presente ensaio foram avaliados sete parâmetros microbiológicos nas amostras de bivalves, nomeadamente, a contagem de microrganismos viáveis totais, a quantificação de coliformes e de *E. coli*, quantificação de estreptococos fecais, contagem de esporos sulfito-redutores, contagem de pseudomonas e pesquisa e contagem de vibrio.

Contagem microrganismos viáveis totais

Procedeu-se à contagem total de microrganismos viáveis totais segundo a ISO 4833-2 (2013) adaptada. Inoculou-se, numa câmara de segurança biológica (Bio Safe 2 Ehert) 0,1 ml da suspensão-mãe (10^{-1}) preparada como descrito em cima, por espalhamento à superfície numa placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura tryptic soy agar (TSA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) com 2 % de sal marinho (adaptação do meio para multiplicação de bactérias de origem marinha). Repetiu-se este procedimento para as diluições 10^{-2} e 10^{-3} .

Incubaram-se as placas em aerobiose na estufa a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ (ICP500 Memmert), durante 48 a 72 horas. Determinou-se o número de microrganismos por contagem direta de todas as colónias presentes nas placas e foram tidas em conta para efeitos de cálculo apenas as placas que continham menos de 300 colónias (Fig. 10). Os resultados foram expressos em UFC/100g.

Para caracterização, repicaram-se cinco colónias isoladas por amostra para placas de TSA com 2 % de sal, foram incubadas a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas, período após o qual se realizaram testes bioquímicos de confirmação:

- Teste do Hidróxido de Potássio (KOH): teste para diferenciar colónias gram positivas e negativas, o teste considera-se positivo quando o KOH destrói a parede celular de bactérias gram-negativas e liberta material cromossômático de consistência viscosa. As bactérias gram-positivas não sofrem qualquer reação na presença do KOH (Health Protection Agency, 2004).
- Teste da ID Color catálase (bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, France): para as colónias gram-positivas realizou-se este teste para confirmar se possuem a enzima catálase responsável pela degradação do peróxido de hidrogénio. Esta enzima existe principalmente em bactérias aeróbias e aeróbias facultativas e na presença de H_2O_2 degradam esta molécula, libertando água e oxigénio visível com a formação de bolhas (Health Protection Agency, 2006).
- Teste da oxidase (Becton, Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152, USA): utiliza-se para determinar se o microrganismo possui a enzima citocromo oxidase. O sistema citocromo está presente em organismos aeróbios com capacidade de utilizar o oxigénio como recetor final de hidrogénio (Health Protection Agency, 2005).

Figura 10 Placa de Petri (90 mm) com UFC de microrganismos viáveis totais.



Quantificação de Coliformes e *E. coli*

Procedeu-se à quantificação de coliformes e *E. coli* utilizando o método do número mais provável (NMP), seguido de confirmação em agar cromogénico, de acordo com o método adaptado do descrito na ISO 16649-3 (2015).

Na câmara de segurança biológica (Ehret) inocularam-se três séries de cinco tubos: na primeira série semeou-se 10 ml da suspensão-mãe (10^{-1}), em cada tubo contendo 10 ml de solução de glutamato modificado com minerais (MMGB, Oxoid) de concentração dupla; na segunda série, semeou-se 1 ml da suspensão-mãe em cada tubo, contendo MMGB de concentração simples e na terceira 1 ml da diluição 10^{-2} nos tubos com MMGB de concentração simples. Incubaram-se os tubos semeados no banho de incubação a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas.

Consideraram-se suspeitos os tubos que apresentaram produção de ácido (viragem da cor lilás do meio para amarelo), procedendo-se à confirmação por repicagem dos tubos suspeitos, na câmara de segurança biológica (Biohazard Braun 2,4 micro), utilizando ansas de 10 μl , para placas (90 mm) contendo meio de cultura chromocult coliform agar (CHR, Merck), na ISO o meio utilizado é o tryptone bile x-glucuronide medium (TBX), este só permite confirmar a presença de *E. coli* pelo que se utilizou o CHR. Incubaram-se as placas na estufa (Heraeus) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas.

Considerou-se a presença de colónias roxas indicadoras da presença de *E. coli* e a presença de colónias vermelhas e roxas pertencentes do grupo coliformes. Registou-se o número de tubos que apresentavam reação positiva (em cada série) e utilizou-se a tabela do número mais provável (NMP), presente na ISO 7218, 2007/Amd.1,2013, para o cálculo do NMP em 100 g de amostra.

Figura 11 Placa de Petri com meio seletivo cromogenico diferenciando por cores *E. coli* e coliformes.



Quantificação de Streptococos Fecais

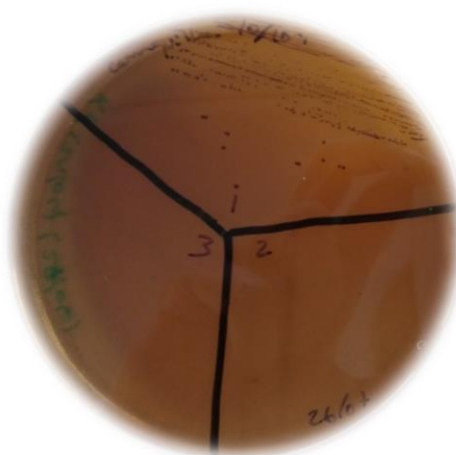
A quantificação de estreptococos fecais foi efetuada de acordo com a ISO 7899-1 (1998) adaptada (Procedimento Técnico de Métodos Analíticos do Laboratório de Microbiologia, PTMA/MIC 04a., 2014). Inocularam-se três séries de três tubos: na primeira semeou-se 10 ml da suspensão-mãe (10^{-1}) em cada tubo, contendo 10ml de solução de azide dextrose broth (Rothe, Oxoid) de concentração dupla; na segunda série, semeou-se 1 ml da suspensão-mãe em cada tubo, contendo meio de concentração simples e na terceira série 1 ml da diluição 10^{-2} .

Após 48 horas de incubação na estufa a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ os tubos suspeitos, os tubos que apresentavam um precipitado no fundo, foram repicados para tubos com meio de cultura Ethyl Violet Azide (EVA) Broth (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France), e incubados à mesma temperatura durante 48 horas.

Posteriormente, os tubos suspeitos (que apresentação precipitado roxo) foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura Kenner Fecal (KF) streptococcus agar (Merck). Após 48 horas de incubação das placas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ procedeu-se às leituras registrando-se o número de tubos que apresentaram reação positiva, ou seja, crescimento de colônias castanhas (Fig. 12).

Registou-se o número de tubos que apresentavam reação positiva (em cada série) e utilizou-se a tabela do número mais provável (NMP), presente na ISO 7218, 2007/Amd.1,2013, para o cálculo do NMP em 100 g de amostra.

Figura 12 Placa de Petri com colônias de estreptococos fecais em meio de cultura.



Contagem de Esporos Sulfito-Redutores

Seguindo a ISO 15213 (2003) adaptada (PTMA/MIC 15a., 2014), procedeu-se à contagem de esporos sulfito redutores. As várias diluições decimais, foram inativadas a 80 °C durante 15 minutos, seguindo-se um choque térmico em banho de água fria. Inocularam-se, na câmara de segurança biológica (Braun), por incorporação em placas (90 mm) 1 ml da solução 10^{-1} e 1 ml da diluição 10^{-2} , com o meio de cultura perfringens agar base (tryptose sulphite cycloserine e shahadi ferguson perfringens, Oxoid). Incubaram-se as placas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 48 horas em anaerobiose (em caixas fechadas com um indicador de presença de oxigénio e um reagente gerador de anaerobiose). Determinou-se o número de esporos por contagem direta das colónias pretas e os resultados foram expressos em UFC/g.

Contagem de *Pseudomonas* spp.

Realizou-se a contagem de *Pseudomonas* spp. de acordo com o método da ISO 13720 (2010). Inoculou-se, na câmara de segurança biológica (Braun), por espalhamento à superfície 1 ml da solução-mãe em duas placas de Petri de 120 mm de diâmetro (0,5 ml de inóculo em cada) contendo meio de cultura seletivo de pseudomonas - Cetrimida e Ácido Nalidíxico ou Cetrimida, Fucidina e Cefaloridina (Merck) agar mais suplemento Cetrimida, Fucidina e Cefaloridina (Oxoid), e 0,1 ml da suspensão-mãe numa placa com 90 mm de diâmetro. As placas foram incubadas na estufa a $22 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 48 horas. Foram repicadas colónias características para a realização do teste do KOH e oxidase. Também foi confirmado o tipo respiratório (oxidativo ou fermentativo) em meio O/F de Hugh e Leifson (Merck), adicionado de uma solução de glucose, esterilizada por filtração, de modo a que a concentração final deste hidrato de carbono no meio seja de 1 %. São consideradas características as colónias com reação positiva aos testes do KOH e oxidase e com reação negativa à fermentação da glucose.

Foi calculada a proporção de colónias características a partir da contagem total, sendo os resultados expressos em UFC/g.

Pesquisa e Contagem de *Vibrio*

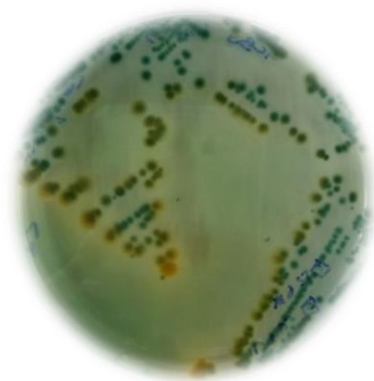
A pesquisa e contagem de *Vibrio* foi realizada de acordo com a ISO 21872-1 (2017) adaptada (PTMA/MIC 11a., 2017). Para a realização da contagem de vibrios, inoculou-se, na câmara de segurança biológica (Ehret), por espalhamento à superfície 1 ml da suspensão-mãe de APW em duas placas de 120 mm de diâmetro (0,5 ml de inóculo em cada) e 0,1 ml numa placa de 90 mm contendo meio de cultura cholera médium Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS, Oxoid). Após incubação a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas realizou-se a contagem das colónias características verdes e amarelas.

Para a pesquisa, o frasco de APW foi incubado a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas, e repicou-se, na camara biológica de segurança (Braun), por estria à superfície duas placas (90 mm) contendo meio de cultura TCBS com uma ansa de 10 µl. Após incubação das placas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas fez-se a contagem das colónias características verdes e amarelas.

As colónias características foram repicadas para TSA com 2 % de sal, e incubadas nas mesmas condições. Foi realizado o teste do KOH e da oxidase (oxidase reagente droppers, Becton, Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152, USA). São consideradas características as colónias com reação positiva aos dois testes.

Na contagem, foi calculada a proporção de colónias características (Fig. 13) a partir da contagem total, sendo os resultados expressos em UFC/g.

Figura 13 Placa de Petri com colónias (amarelas e verdes) características de *Vibrio* sp.



2.3 Tratamento de Resultados

Todos os resultados do ensaio I foram analisados estatisticamente, após transformação $\log_{10}(x+1)$, através do programa informático “STATISTICA 6” (Statsoft, Inc., Tulsa, OK74104, USA). Todos os valores obtidos com $<$ foram transformados em metade do respetivo valor numérico. O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre várias condições, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD).

Quando não foram cumpridos os pressupostos da normalidade e homogeneidade de variância, recorreu-se a uma análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida do teste de comparação múltipla.

Foi realizada uma análise estatística descritiva aos dados obtidos no ensaio II, quando aplicável, com recurso a medidas de tendência central e de dispersão, respetivamente mediana, intervalo interquartil (IQ) e amplitude.

3. Resultados e Discussão

3.1 Ensaio I

Observou-se alguma variação na qualidade microbiológica inicial dos diferentes bivalves vivos estudados no presente ensaio.

Relativamente aos microrganismos viáveis totais, os bivalves apresentavam níveis médios de contaminação entre 6,4 e 8,0 Log₁₀ UFC/100g (Tabela 1). Os teores mais baixos foram observados nas espécies provenientes de zonas de produção litorais, como a ameijola, longueirão e mexilhão, enquanto os valores mais elevados foram registados nas espécies provenientes de zonas de produção estuarino-lagunares (amêijoa-boia, amêijoa-japonesa, amêijoa-macha e ostra). Estes resultados estão de acordo com o esperado, dado que as zonas de produção litorais estão menos sujeitas a pressões antropogénicas (CEFAS, 2017), apresentando habitualmente níveis de contaminação inferiores aos das zonas estuarino-lagunares (Despacho nº 1851/2017). Apenas a amêijoa boia, apresentava níveis médios de contaminação superiores ao valor guia definido para este parâmetro por entidades internacionais, que é 7,7 Log₁₀ UFC/100g (ICMSF, 1986).

Os bivalves apresentavam níveis médios de contaminação por coliformes entre 1,3 e 3,2 Log₁₀ NMP/100g (Tabela 2). O valor guia proposto para este parâmetro é 2,5 Log₁₀ NMP/100g (Diretiva CEE 91/492). Este limite foi ultrapassado nas amostras de amêijoa-boia, amêijoa-japonesa e longueirão. Era de esperar que a ameijoa-japonesa e a ameijoa-boia tivessem níveis globais de contaminação mais elevados pois provinham de zonas de produção classificadas como B/C. Adicionalmente, o longueirão, também era originário de uma zona litoral classificada como B.

No caso da *E. coli*, os níveis médios de contaminação observados nos bivalves compreendiam-se entre 1,0 e 2,0 Log₁₀ NMP/100g (Tabela 3). Os teores obtidos são todos inferiores ao valor guia para os bivalves destinados ao consumo humano direto, que é 2,4 Log NMP/100g (Reg. nº 853/2004), apesar de algumas das amostras serem provenientes de zonas com grau de contaminação B e C, habitualmente com teores de *E. coli* superiores a 2,4 e 3,7 Log NMP/100g, respetivamente.

Efeito da temperatura de armazenamento/transporte

Nas tabelas 1, 2 e 3 apresentam-se, respetivamente, os resultados obtidos para os microrganismos viáveis totais, coliformes e *E. coli* nas sete espécies de bivalves vivos

estudadas, ensaiadas à chegada ao laboratório, e após simulação de armazenamento/transporte a 1 °C ou 10 °C durante 24 e 48 h.

Observou-se um efeito da temperatura de armazenamento/transporte nos teores médios de microrganismos viáveis totais (Tabela 1) para a amêijoia-macha e para o longueirão. Em ambas as espécies, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de contaminação registados a 1 °C e a 10 °C, obtendo-se a esta última temperatura valores superiores em 0,6 e 1,1 Log, respetivamente, na amêijoia-macha e no longueirão. Esta constatação pode dever-se a desenvolvimento microbiano a 10 °C, dado existirem nos produtos da pesca muitas bactérias mesófilas com características psicrotróficas (Huss, 1997b).

Tabela 1 Teores de microrganismos viáveis totais (LOG UFC/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas.

	Temperatura inicial	1 ± 1 °C	10 ± 1 °C
<i>Amêijoia-boa</i>	8,0 ± 0,8 ^a	7,3 ± 1,0 ^a	7,8 ± 0,9 ^a
<i>Amêijoia-japonesa</i>	7,4 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,3 ^a	7,8 ± 0,5 ^a
<i>Amêijoia-macha</i>	7,3 ± 0,2 ^{ab}	7,2 ± 0,1 ^a	7,8 ± 0,6 ^b
<i>Ameijola</i>	6,6 ± 0,4 ^a	6,7 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,7 ^a
<i>Longueirão</i>	6,4 ± 0,6 ^{ab}	6,3 ± 0,6 ^a	7,4 ± 0,8 ^b
<i>Mexilhão</i>	6,5 ± 0,4 ^a	6,5 ± 0,6 ^a	6,9 ± 0,6 ^a
<i>Ostra</i>	7,6 ± 0,2 ^a	7,2 ± 0,4 ^a	7,5 ± 0,6 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p < 0,05).

A temperatura de armazenamento/transporte teve efeito nos teores médios de coliformes totais para a amêijoia-macha.

Tabela 2 Teores de coliformes totais (NMP/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas

	Temperatura inicial	1 ± 1°C	10 ± 1°C
<i>Amêijoa-boa</i>	2,7 ± 0,7 ^a	3,0 ± 0,7 ^a	2,9 ± 1,0 ^a
<i>Amêijoa-japonesa</i>	2,8 ± 1,1 ^a	3,0 ± 0,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^a
<i>Amêijoa-macha</i>	2,2 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,4 ^b	2,6 ± 0,5 ^a
<i>Ameijola</i>	2,3 ± 1,2 ^a	2,4 ± 1,2 ^a	2,6 ± 1,3 ^a
<i>Longueirão</i>	3,2 ± 0,7 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	3,5 ± 0,7 ^a
<i>Mexilhão</i>	1,9 ± 0,8 ^a	2,1 ± 0,9 ^a	2,6 ± 1,0 ^a
<i>Ostra</i>	1,3 ± 0,7 ^a	2,5 ± 0,5 ^a	2,0 ± 0,7 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p < 0,05).

Verificou-se que a concentração média de coliformes (Tabela 2) observados na amêijoa-macha armazenada/transportada a 1 °C era estatisticamente superior em 1,3 e 0,9 Log à concentração apresentada inicialmente e após armazenamento/transporte a 10 °C, respetivamente. Apesar destes resultados serem inesperados, são semelhantes aos anteriormente descritos por outros autores (CEFAS, 2006). Dado que, na mesma amostra de bivalves vivos, pode ocorrer variação no nível e tipo de contaminação microbiológica (Huss, 1997a; CEFAS, 2017) é possível que os exemplares armazenados/transportados à temperatura inferior possuísem uma flora capaz de se desenvolver a 1 °C. De facto, está descrito que temperatura mínima de crescimento para o grupo dos coliformes totais é -2 °C (Batt & Tortorello, 2014), existindo algumas estirpes pertencentes à espécie *Yersinia enterocolitica* capazes de se desenvolver a temperaturas abaixo de 0 °C (Bergann, Kleemann & Sohr, 1995; Huss, Ababouch & Gram, 2004). Adicionalmente, o método utilizado neste trabalho, para o parâmetro coliformes baseia-se na deteção da enzima β-D-galactosidase e determinadas estirpes da *Y. enterocolitica* possuem esta enzima (Schmiel, Young e Miller, 2000).

A temperatura de armazenamento/transporte não teve qualquer efeito nos teores médios de *E. coli* apresentados pelas várias espécies de bivalves vivos (Tabela 3).

Tabela 3 Teores de *E. coli* (NMP/100g) obtidos nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados a duas temperaturas.

	Temperatura inicial	1 ± 1 °C	10 ± 1 °C
<i>Amêijoia-boa</i>	1,2 ± 0,4 ^a	1,3 ± 0,4 ^a	1,3 ± 0,4 ^a
<i>Amêijoia-japonesa</i>	2,0 ± 1,2 ^a	1,9 ± 1,1 ^a	1,9 ± 1,2 ^a
<i>Amêijoia-macha</i>	1,9 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,4 ^a	1,5 ± 0,3 ^a
<i>Ameijola</i>	1,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^a
<i>Longueirão</i>	1,5 ± 0,9 ^a	1,5 ± 0,8 ^a	1,5 ± 0,8 ^a
<i>Mexilhão</i>	1,2 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,3 ^a
<i>Ostra</i>	1,3 ± 0,7 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,6 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05).

Neste contexto, o armazenamento/transporte dos bivalves vivos destinados a ensaios microbiológicos, durante 24 a 48 h, na gama de temperatura recomendada, entre 0 °C a 10 °C (ISO 6887-3, 2017), não influencia os resultados *E. coli*, obtidos para o controlo oficial das zonas de produção.

Efeito do tempo de armazenamento/transporte

Nas tabelas 4, 5 e 6 apresentam-se, respetivamente, os resultados obtidos para os microrganismos viáveis totais, coliformes e *E. coli* nas sete espécies de bivalves vivos estudadas, ensaiadas à chegada ao laboratório, e após simulação de armazenamento/transporte entre 1 e 10 °C durante 24 h ou 48 h.

Tabela 4 Teores de microrganismos viáveis totais (UFC/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.

	0 H	24 H	48 H
<i>Amêijoia-boa</i>	8,0 ± 0,8 ^a	7,4 ± 1,1 ^a	7,7 ± 0,9 ^a
<i>Amêijoia-japonesa</i>	7,4 ± 0,5 ^a	7,4 ± 0,4 ^a	7,7 ± 0,5 ^a
<i>Amêijoia-macha</i>	7,3 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,1 ^a	7,8 ± 0,6 ^a
<i>Ameijola</i>	6,6 ± 0,4 ^a	6,7 ± 0,5 ^a	7,1 ± 1,0 ^a
<i>Longueirão</i>	6,4 ± 0,6 ^a	6,7 ± 0,7 ^a	7,1 ± 1,0 ^a
<i>Mexilhão</i>	6,5 ± 0,4 ^a	6,4 ± 0,6 ^a	7,0 ± 0,2 ^a
<i>Ostra</i>	7,6 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,2 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05).

Após análise dos resultados verificou-se que o tempo de armazenamento/transporte não teve efeito nos teores médios de microrganismos viáveis totais, coliformes totais ou *E. coli* em nenhuma das espécies estudadas.

Tabela 5 Teores de coliformes totais (NMP/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.

	0 H	24 H	48 H
<i>Amêijoia-boa</i>	2,7 ± 0,7 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	3,0 ± 1,2 ^a
<i>Amêijoia-japonesa</i>	2,8 ± 1,1 ^a	3,0 ± 0,9 ^a	3,1 ± 1,0 ^a
<i>Amêijoia-macha</i>	2,2 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,6 ^a	3,1 ± 0,8 ^a
<i>Ameijola</i>	2,3 ± 1,2 ^a	2,3 ± 1,2 ^a	2,6 ± 1,3 ^a
<i>Longueirão</i>	3,2 ± 0,7 ^a	3,2 ± 0,6 ^a	3,6 ± 0,5 ^a
<i>Mexilhão</i>	1,9 ± 0,8 ^a	2,3 ± 0,8 ^a	2,4 ± 1,1 ^a
<i>Ostra</i>	1,3 ± 0,7 ^a	2,1 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,6 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05).

Nestas condições, um tempo de armazenamento/transporte dos bivalves vivos destinados a ensaios microbiológicos entre 24 a 48 h (ISO 6887-3, 2017), não influencia os resultados dos três parâmetros microbiológicos ensaiados, sendo estes tempos de armazenamento/transporte adequados para o controle oficial das zonas de produção.

Tabela 6 Teores de *E. coli* (NMP/100g) nos moluscos bivalves vivos armazenados/transportados durante dois períodos de tempo.

	0 H	24 H	48 H
<i>Amêijoia-boa</i>	1,2 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
<i>Amêijoia-japonesa</i>	2,0 ± 1,2 ^a	2,0 ± 1,2 ^a	1,8 ± 1,1 ^a
<i>Amêijoia-macha</i>	1,9 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0,4 ^a
<i>Ameijola</i>	1,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^a
<i>Longueirão</i>	1,5 ± 0,9 ^a	1,4 ± 0,6 ^a	1,6 ± 1,0 ^a
<i>Mexilhão</i>	1,2 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
<i>Ostra</i>	1,3 ± 0,7 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,6 ^a

Os resultados apresentados correspondem à média ± o desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p <0,05).

Uma vez que as condições de armazenamento/transporte dos bivalves vivos são também importantes para a sua comercialização afigura-se que as temperaturas e tempos testados são

adequados para o armazenamento/transporte destes animais vivos para os centros de depuração/expedição. Não obstante, dado que em duas espécies armazenadas/transportadas a 10 ± 1 °C foram registados teores de microrganismos viáveis totais significativamente superiores ($p < 0,05$) aos observados a 1 ± 1 °C, é recomendável que o armazenamento/transporte dos bivalves vivos para fins comerciais seja realizado a temperaturas de refrigeração inferiores a 10 °C, de modo a evitar alterações na qualidade microbiológica.

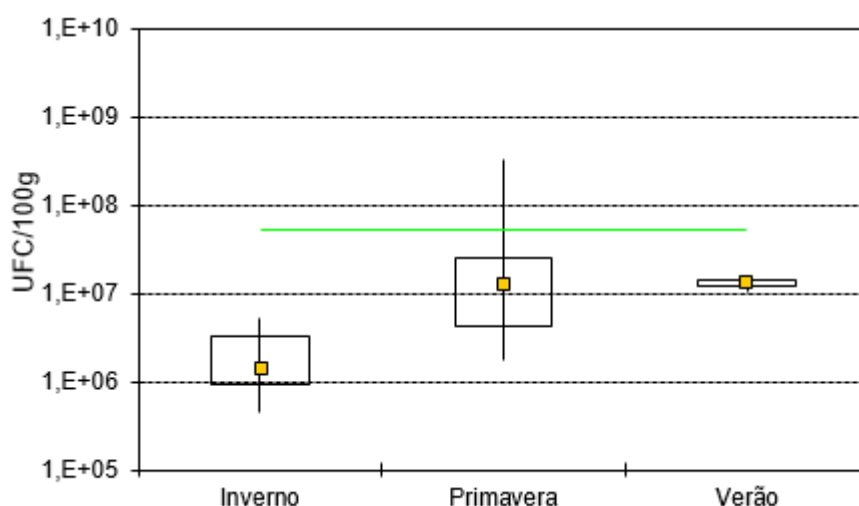
3.2 Ensaio II

No presente ensaio observou-se alguma variação na qualidade microbiológica nas três estações do ano avaliadas (inverno, primavera e verão) e nas três espécies estudadas (ameijola, conculha e longueirão).

Nas figuras seguintes apresentam-se os gráficos dos vários parâmetros estudados agrupados por estação do ano.

Da análise do intervalo interquartil (IQ) para as estações do ano, inverno, primavera e verão concluiu-se que 50% das observações registadas nos bivalves, quanto ao teor em microrganismos viáveis totais (Fig. 14), situavam-se entre $9,3 \times 10^5$ - $3,3 \times 10^6$, $4,2 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$ e $1,2 \times 10^7$ - $1,3 \times 10^7$ UFC/100g, respetivamente, verificando-se níveis de contaminação mais elevados na primavera e no verão.

Figura 14 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de microrganismos viáveis totais obtidos no inverno, primavera e verão.



A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia adaptado de 5×10^7 UCF/100 g (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, 1986) por uma linha verde.

A taxa do metabolismo dos bivalves é mais elevada na primavera e no verão, devido a temperaturas superiores da água do mar (Gosling, 2004), estando a taxa de filtração aumentada,

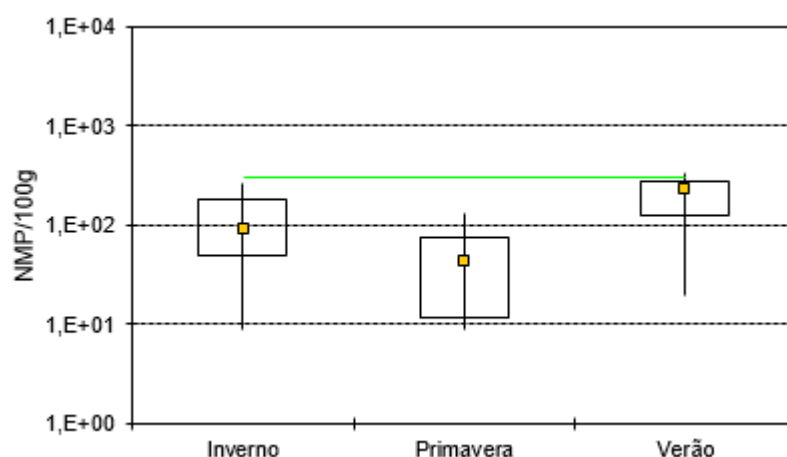
o que origina uma maior acumulação de microrganismos pelos bivalves (Silva, Costa & Rodrigues, 2008). Este facto pode explicar os resultados superiores de microrganismos viáveis totais que ocorreram durante a primavera e o verão. Na primavera foram registados os teores máximos de contaminação, alguns dos quais ultrapassaram o valor guia de 5×10^7 UCF/100 g, recomendado para este parâmetro (ICMSF, 1986).

No verão registou-se uma menor dispersão dos resultados do que nas outras estações, possivelmente devido à ausência de episódios de precipitação que levam à escorrência de contaminação para o meio marinho (Pedro, Cachola, Castilho & Sobral, 2008c)

Relativamente ao teor em coliformes totais observaram-se medianas de 92, 44 e 230 NMP/100 g de moluscos bivalves vivos, respetivamente para o inverno, primavera e verão (Fig. 15).

No verão registaram-se os níveis máximos de contaminação por coliformes, que ultrapassaram o valor guia de 300 NMP/100 g, recomendado para este parâmetro (Ribeiro, 1974).

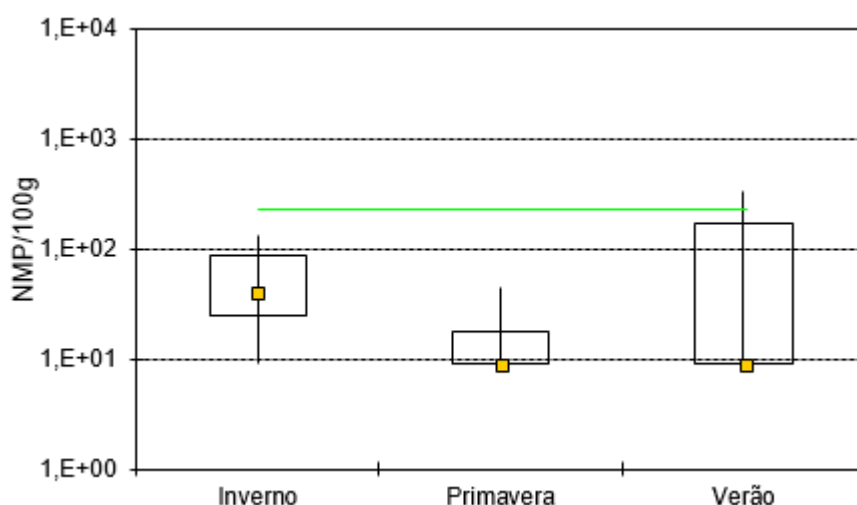
Figura 15 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de coliformes obtidos no inverno, primavera e verão.



A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia de 300 NMP/100 g (Diretiva 91/492) por uma linha verde.

Quanto ao teor em *E. coli*, verificou-se que nas estações do ano estudadas, inverno, primavera e verão, as medianas foram de 40, 9 e 9, respetivamente (Fig. 16). No verão foram observados os níveis máximos de contaminação por *E. coli*, que ultrapassaram o valor guia de 230 NMP/100 g, recomendado para este parâmetro nos bivalves provenientes de zonas com classe A e destinados ao consumo humano direto (Reg. nº 854/2004). Esta constatação pode estar associada a atividades de lazer sazonais, tais como, a utilização das águas balneares.

Figura 16 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de *E. coli* obtidos no inverno, primavera e verão.



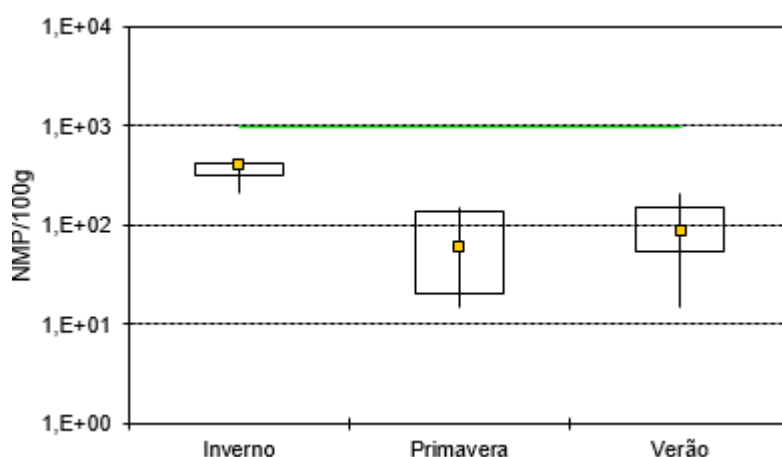
A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia de 230 NMP/100 g (Reg. 864/2004) por uma linha verde.

No que se refere aos estreptococos fecais, as medianas observadas no inverno, primavera e verão (Fig. 17), foram 430, 64 e 92 NMP/100 g, respetivamente.

Os resultados de estreptococos fecais observados no inverno não denotavam grande variabilidade, pelo que este tipo de contaminação não deve estar associado a episódios de precipitação, mas sim a alguma sobrevivência deste grupo de microrganismos no meio marinho.

Como era esperado, estes bivalves provenientes de uma zona litoral (L6) apresentavam níveis de contaminação de origem fecal baixos.

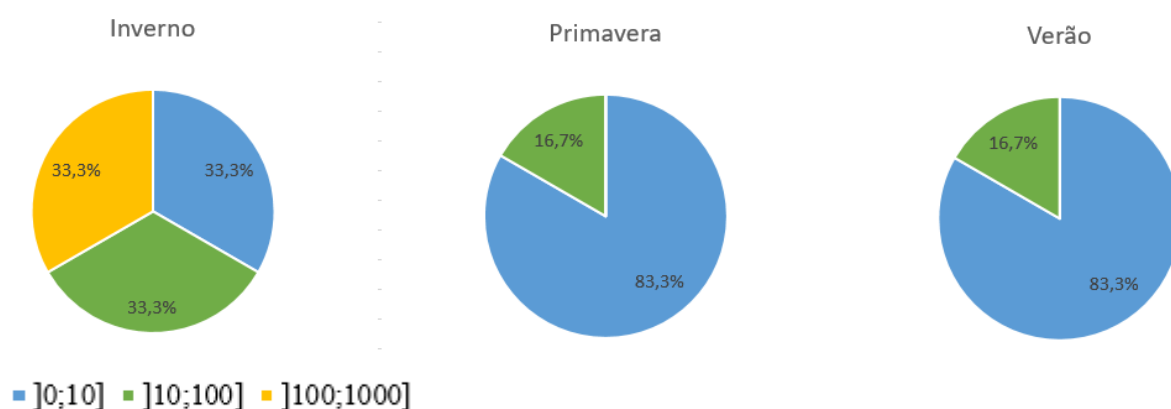
Figura 17 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de estreptococos fecais obtidos no inverno, primavera e verão.



A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia adaptado de 1000 NMP/100 g (Ribeiro, 1974) por uma linha verde.

Relativamente aos esporos sulfito-redutores, observou-se (Fig. 18) que a classe de maior nível de contaminação entre 100 e 1000 UFC/g só ocorreu no inverno e em 33 % das amostras. O facto de se terem obtido teores de esporos mais elevados nesta estação do ano pode estar associado a uma maior agitação marítima com ressuspensão na coluna de água de formas esporuladas presentes no sedimento.

Figura 18 Frequência dos teores de esporos sulfito-redutores obtidos no inverno, primavera e verão.

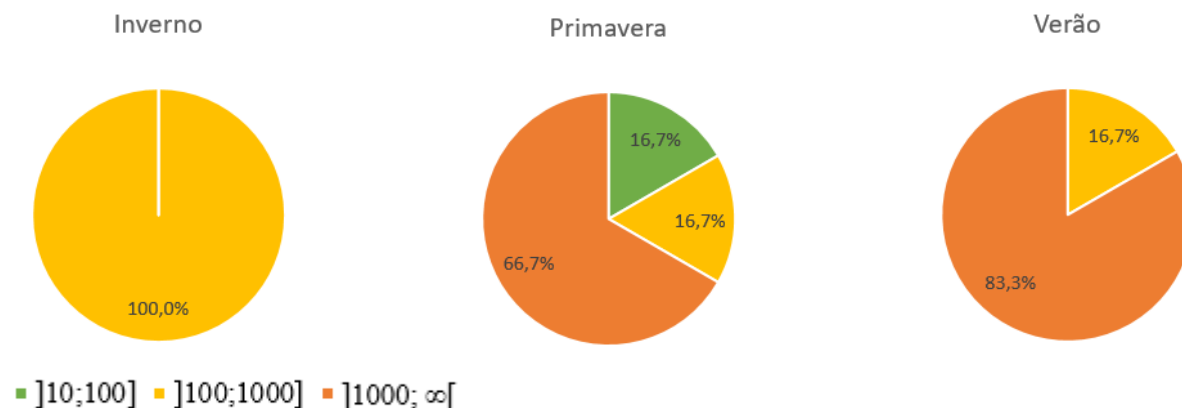


Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

No verão foi observada a maior proporção (83,3 %) de amostras (Fig. 19) com teores mais elevados de pseudomonas ($>10^3$ UFC/g). Este facto pode dever-se a uma maior temperatura da água, uma vez que a temperatura ótima de multiplicação destas bactérias é 28 °C (Jaouen, Dé, Chevalier & Orange, 2004).

A família das *Pseudomonas* representa um dos grupos de microrganismos dominantes na microflora dos bivalves (Cao, Xue & Liu, 2009), encontrando-se bem adaptadas ao meio aquático, pelo que estas bactérias foram detetadas nas três estações do ano testadas.

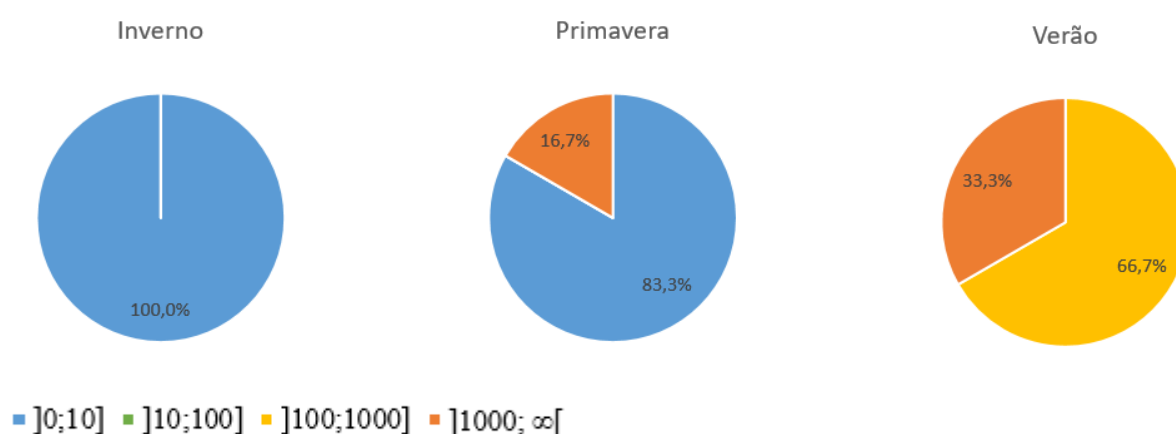
Figura 19 Frequência dos teores de pseudomonas obtidos no inverno, primavera e verão.



Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

Quanto às bactérias pertencentes ao género *Vibrio*, estas não foram detetadas no inverno, dado que a temperatura média da água do mar é 14, e os vibrios tendem a ser detetados nas águas que apresentam temperaturas superiores a 17 °C (Pruzzo, Gallo & Canesi, 2005). No verão todas as amostras encontravam-se contaminadas por esta bactéria, apresentando 33 % das amostras o nível mais elevado de contaminação ($>10^3$ UFC/g), ultrapassando o valor guia adoptado para este parâmetro de 10^3 UFC/g (ICMF, 1986). Assim é recomendável que os moluscos bivalves capturados nesta estação do ano sejam refrigerados com maior brevidade possível, de modo a evitar o aumento dos teores destas bactérias.

Figura 20 Frequência dos teores de vibrio obtidos no inverno, primavera e verão.



Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

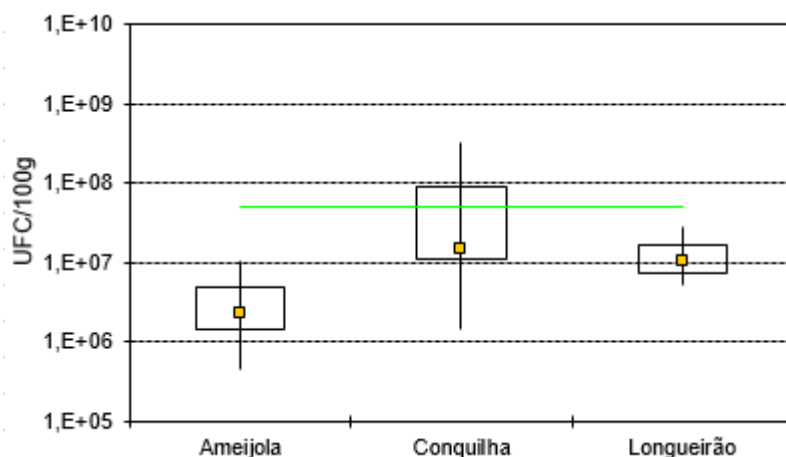
Nas figuras seguintes apresentam-se os gráficos dos vários parâmetros estudados agrupados por espécies.

Relativamente aos microrganismos viáveis totais, a análise do IQ para as espécies de bivalves estudadas, demonstrou que 50% das observações registadas na ameijola, conculha e longueirão, situavam-se entre $1,4 \times 10^6$ - $4,8 \times 10^6$, $1,1 \times 10^7$ - $9,2 \times 10^7$ e $7,3 \times 10^7$ - $1,7 \times 10^7$ UFC/100g, respetivamente (Fig. 21).

Possivelmente a ameijola apresentou menores níveis de contaminação dos que as restantes espécies devido à localização do seu banco de pesca ser a uma batimetria superior (Gaspar, 2015) e portanto mais distante da costa e menos sujeita a contaminações.

A conculha apresenta uma maior dispersão dos resultados, que pode dever-se à sua localização, uma vez que esta espécie está mais próxima da costa, pelo que está mais exposta a contaminações de origem antropogénica e telúrica.

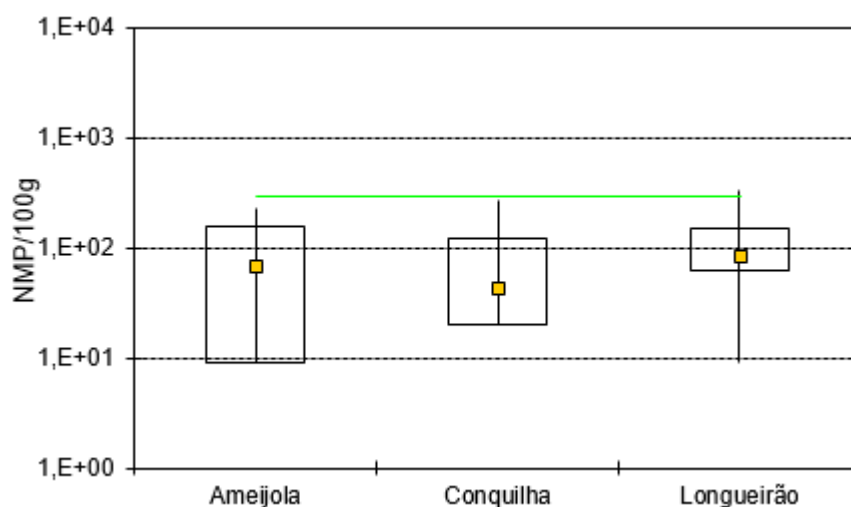
Figura 21 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de microrganismos viáveis totais em ameijola, conculha e longueirão.



A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia adaptado de 5×10^7 UCF/100 g (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, 1986) por uma linha verde.

Quanto ao teor em coliformes totais, as medianas registadas para a ameijola, conculha e longueirão, eram de 70, 44 e 85 NMP/100g, respetivamente (Fig. 22). O longueirão foi a espécie que apresentou níveis mais elevados de contaminação por coliformes, com algumas amostras a ultrapassarem o valor guia recomendado para este parâmetro de 300 NMP/100 g (Ribeiro, 1974; Diretiva 91/492).

Figura 22 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de coliformes em ameijola, conculha e longueirão.



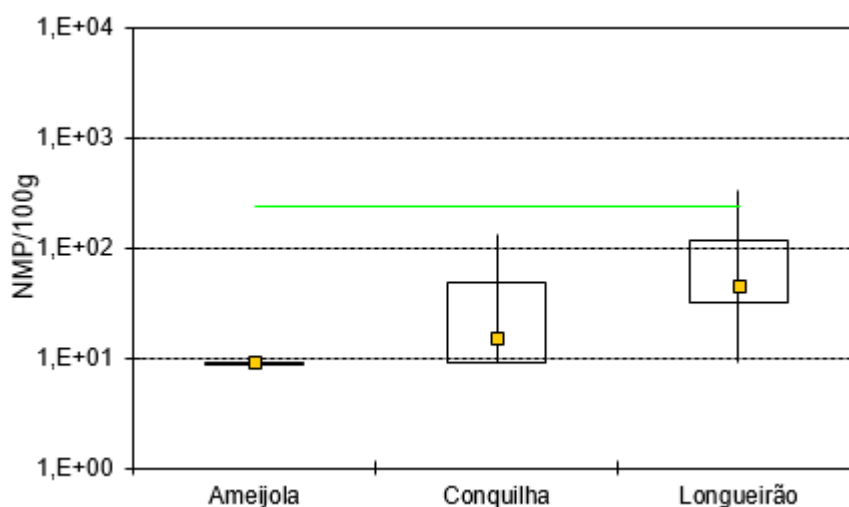
A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia de 300 NMP/100 g (Diretiva 91/492) por uma linha verde.

No que se refere ao teor em *E. coli*, verificou-se que as medianas registadas na ameijola, conculha e longueirão, eram 9, 15 e 43 NMP/100 g, respetivamente (Fig. 23).

É de realçar que o teor máximo de 330 NMP/100g foi obtido no longueirão, o qual ultrapassa o valor guia de 230 NMP/100g para as zonas de produção classificadas como A. Não foi detetada *E. coli* em nenhuma amostra de ameijola. De facto, as espécies estudadas foram provenientes da zona de produção litoral, designada como L6, em que a ameijola e a conculha estão classificadas como A, enquanto o longueirão está classificado como B, em que o valor máximo para contaminação por *E. coli* é 4600 NMP/100 g (Despacho n.º 1851/2017).

Como os dados históricos da monitorização desta zona pelo IPMA demostram a existência de uma diferença entre os teores de *E. coli* apresentados pelo longueirão e os das outras duas espécies, possivelmente devido à maior capacidade de bioacumulação do longueirão (Carro, García, Ignacio & Mouteira, 2012), e tendo em consideração os resultados obtidos, é recomendável que a monitorização microbiológica desta zona inclua as três espécies.

Figura 23 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor de *E. coli* em ameijola, conculha e longueirão.

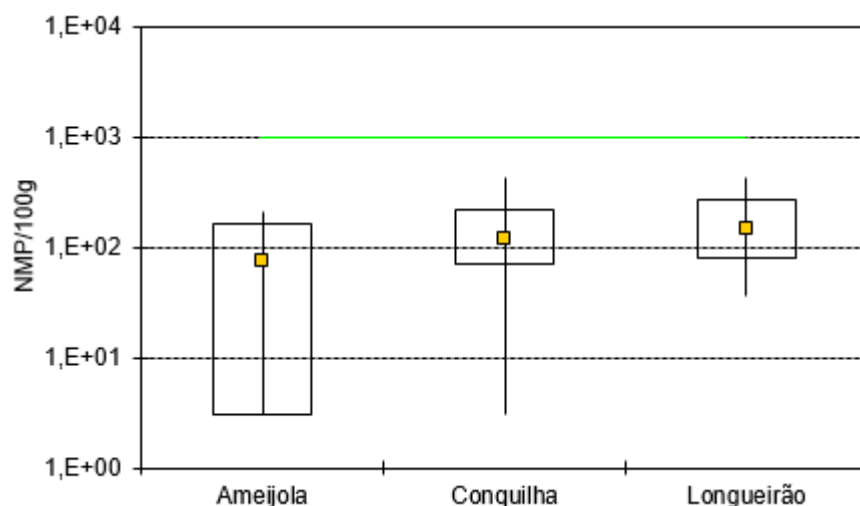


A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia de 230 NMP/100 g (Reg. 864/2004) por uma linha verde.

Relativamente aos estreptococos, as medianas da ameijola, conculha e longueirão (Fig. 24), foram 83, 121 e 151 NMP/100 g, respetivamente.

Mais uma vez foi constatado que a ameijola apresentava teores mais baixos deste grupo de bactérias do que as restantes espécies.

Figura 24 Diagrama de extremos e quartis relativo ao teor estreptococos fecais em ameijola, conculha e longueirão.

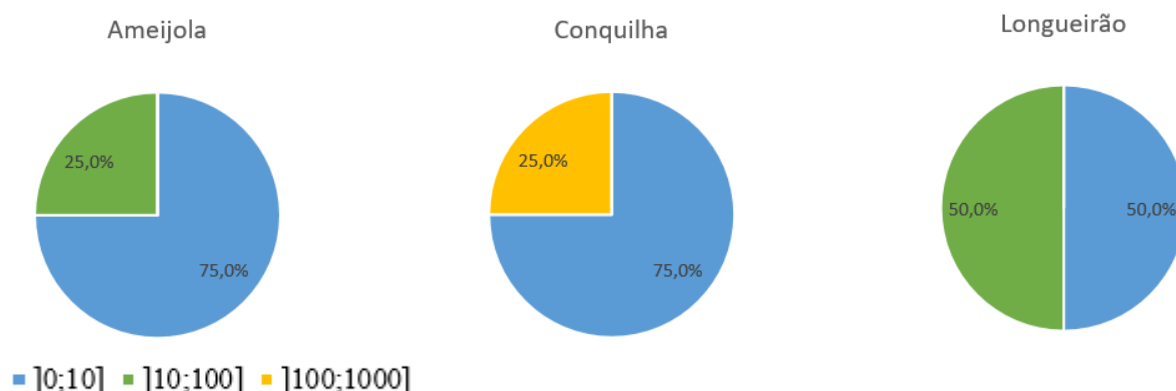


A mediana está representada por um quadrado amarelo, o IQ por um polígono e o valor guia adaptado de 1000 NMP/100 g (Ribeiro, 1974) por uma linha verde.

No caso dos esporos sulfito-redutores, observou-se (Fig. 25) que a conculha foi a espécie que apresentou teores mais elevados de contaminação, que foram registados em 25 % das amostras. O facto de se ter obtido teores de esporos mais elevados na conculha, pode advir da sua maior

proximidade à região costeira onde existe maior agitação marítima com eventual ressuspensão de partículas do sedimento. Apenas 25 % das amostras de ameijola exibiam contaminação por esporos sulfito-redutores, em baixos teores ($\leq 10^2$ UFC/g).

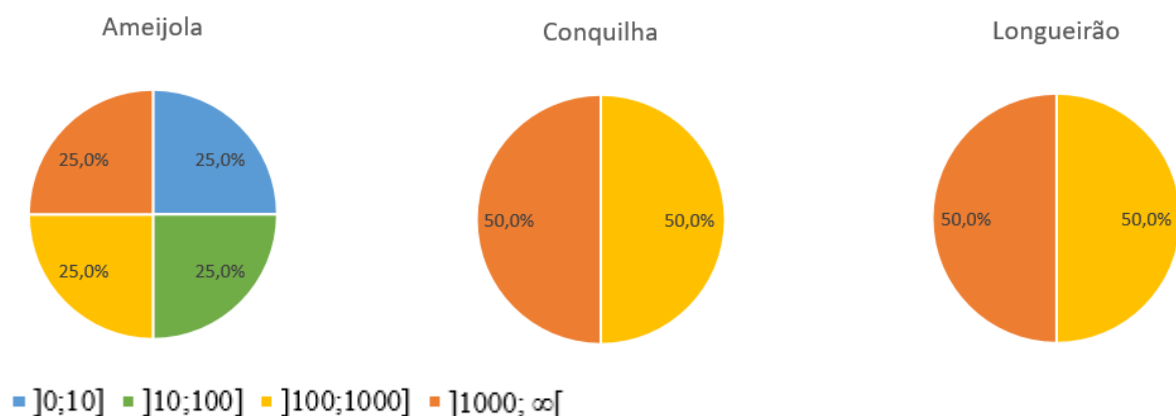
Figura 25 Frequência dos teores de esporos sulfito-redutores em ameijola, conquilha e longueirão.



Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

Quanto ao teor de pseudomonas verificou-se (Fig. 26) que foi a ameijola a espécie a apresentar menor contaminação, não tendo sido detetado este grupo de bactérias em 25 % das amostras. Nas restantes espécies, os teores de pseudomonas foram superiores a 10^3 UFC/g em 50 % das amostras.

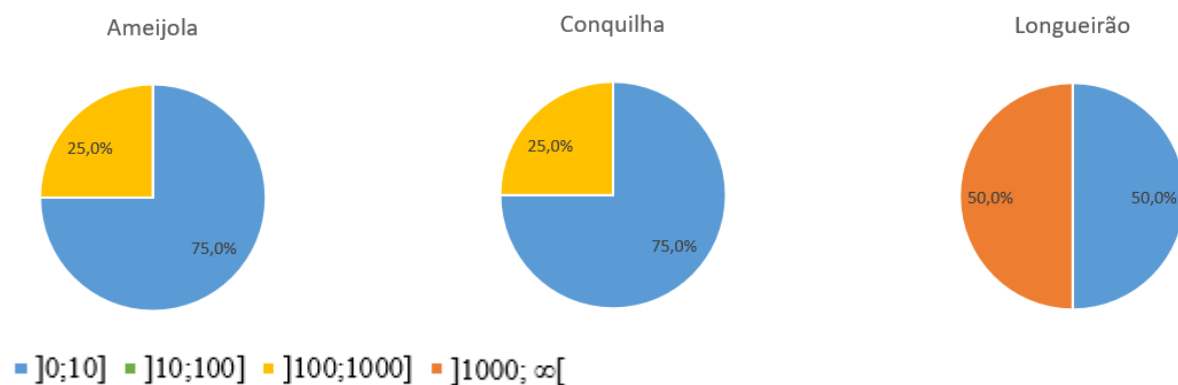
Figura 26 Frequência dos teores de pseudomonas em ameijola, conquilha e longueirão.



Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

Relativamente ao teor em vibrios, verificou-se que todas as espécies se apresentavam contaminadas. Destas, o longueirão foi a espécie que apresentou níveis mais elevados de contaminação, com 50 % das amostras superiores a 10^3 UFC/g (Fig. 27).

Figura 27 Frequência dos teores de vibrios em ameijola, conchilha e longueirão.



Expressos em UFC/g de moluscos bivalves vivos.

Uma vez que o vibrio persiste no ambiente marinho, associado as espécies de fitoplâncton e zooplâncton (OMS, 2010), os níveis de contaminação observados no longueirão podem dever-se, eventualmente, a hábitos alimentares específicos.

Conclusão

As condições de transporte de moluscos bivalves vivos destinados a ensaios microbiológicos a temperaturas entre 0 °C e 10 °C durante 24 a 48 h (ISO 6887-3, 2017) são adequadas para o controlo oficial das zonas de produção de bivalves, uma vez que não foi observado qualquer efeito da temperatura ou do tempo nos teores de *E. coli* dos bivalves vivos, os quais determinam o estatuto sanitário das zonas de produção.

No entanto, uma vez que a temperaturas de armazenamento/transporte de 10 °C foram registados, em duas espécies, teores significativamente superiores de microrganismos viáveis totais do que a 1 °C, é recomendável que o armazenamento/transporte dos bivalves vivos para fins comerciais seja realizado a temperaturas de refrigeração inferiores a 10 °C, de modo a evitar alterações na qualidade microbiológica.

Apesar dos tempos de armazenamento/transporte dos bivalves vivos testados (entre 24 a 48 h), não terem influenciado os resultados de coliformes ou microrganismos viáveis totais, é recomendável que estes animais vivos sejam transportados para o seu destino comercial com maior brevidade possível de modo a manterem uma boa viabilidade.

Verificou-se que no inverno ocorriam os menores níveis de contaminação para a maior parte dos parâmetros avaliados. No verão foram registados os teores mais elevados de coliformes, *E. coli*, pseudomonas e vibrio, sendo recomendável que os moluscos bivalves capturados nesta estação do ano sejam refrigerados com a maior brevidade possível, de modo a evitar o aumento dos teores destas bactérias.

De um modo geral, a ameijola apresentou menores níveis de contaminação do que as restantes espécies para a maior parte dos parâmetros avaliados. Esta observação pode dever-se ao facto da localização do seu banco de pesca ser a uma batimetria superior e portanto encontrar-se mais distante da costa e menos sujeita a contaminações.

Por outro lado, o longueirão foi a espécie que apresentou maiores níveis de contaminação, em particular, para os parâmetros de coliformes, *E. coli*, estreptococos fecais e vibrio.

Tendo em consideração estes últimos resultados, é recomendável que a monitorização microbiológica da zona de produção L6 continue a incluir as três espécies estudadas.

Bibliografia

- Anon (2017). Community guide to the principles of good practice for the microbiological classification and monitoring of bivalve mollusc production and relaying areas with regard to regulation 854/2004. Issue 6. Acedido Abril 10, 2017, disponível em: <https://eur1cefas.org/public-documents/official-control-guides.aspx>.
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K. & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. In Loma Fewtrell and Jamie Bartram (Eds), *Water quality: Guidelines, standards and health*. (pp. 289-316) London, IWA Publishing.
- Batt, A. C. & Totorello, M. (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (2nd ed.). London: Elsevier. Acedido em Setembro 5, 2017, disponível em: <https://books.google.pt/books?id=1b1CAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H. & Davies, A. (2011). *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. Bruxelas: International Life Sciences Institute.
- Bayne, B.L. (1976). *Marine mussels: Their ecology and physiology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Beliaeff, B. & Cochard, M.L. (1995). Applying geostatistics to identification of spatial patterns of faecal contamination in a mussel farming área (Havre de la Vanlée, France). *Water Research*, 29, 1541-1548.
- Bergann, T., Kleemann, J. & Sohr, D. (1995). Modeluntersuchungen zur psychrotrophie von *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Veterinary Medicine*, B 42, 523-531.
- Bernard, F.R. (1989). Uptake and elimination of coliform bacteria by four marine bivalve molluscs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 1592-1599.
- Brink, L.A. (2001). Mollusca: Bivalvia. In Alan L. Shank (Eds.), *An Identification Guide to the Larval Marine Invertebrates of the Pacific Northwest*. (pp. 129-149). Oregon: Oregon Institute of Marine Biology.
- Cachola, R. & Silva, H. A. (2008). Depuração dos moluscos bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal*. (pp. 112-119). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Canesi, L., Pezzati, E., Stauder, M., Grande, C., Bavestrello, M., Papetti, A., Vezzulli, L. & Pruzzo, C. (2013). *Vibrio cholerae* interactions with *Mytilus galloprovincialis* hemocytes mediated by serum components. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-6.
- Cao, R., Xue, C. & Liu, Q. (2009). Changes in microbial flora of pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 272-276.
- Carro, N. García, I., Ignacia, M. & Mouteira, A. (2012). Organochlorine pesticide levels in *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) from Ría de Vigo, Galicia (N.W. Spain): Influence of season, condition index and lipid content. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 491-496.
- CEFAS (2006). The effect of time and temperature on the *Escherichia coli* content of live bivalve molluscs. UK NRL Report. Acedido em Abril 10, de 2017, disponível em: <https://www.cefas.co.uk/nrl/information-centre/reports/the-effect-of-time-and-temperature-on-the-escherichia-coli-content-of-live-bivalve-molluscs>.

- CEFAS (2017). *Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas. Guide to Good Practice: Technical Application*. Weymouth.
- Cook, D.W. & Ruple, A.D. (1989) Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in post harvest shellstock oysters. *Journal of Food Protection*, 52, 343-349.
- Despacho nº 1851/2017 de 3 de Março. *Diário da República*, nº 45 – 2 Série. Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Ambiente e Mar. Lisboa.
- DGRM (2016). *Estatísticas da pesca 2015*. Lisboa: Instituto Nacional De Estatística.
- DGRM (2017). Aquicultura – Tipos de estabelecimento. Acedido em Abril 10, 2017, disponível em: https://www.dgrm.mm.gov.pt/xportal/xmain?xpid=dgrm&actualmenu=1470669&selectedmenu=1470673&xpgid=genericPageV2&conteudoDetalhe_v2=169705.
- Diretiva 91/492 do Conselho de 15 de Julho de 1991 que estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Duncan, P. F. (1993). Post-harvest physiology of scallop *Pecten maximus* (L.). Ph.D. Thesis. University of Glasgow.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., et al. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2993-2998.
- FAO (2010). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Roma.
- FAO (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Roma.
- FAO (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Contributing to food security and nutrition for all. Roma.
- FAO (2017). Species Fact Sheets. Acedido em Jun. 8, 2017, disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/3542/en>.
- Félix, S.I.A. (2012). Revisão do sistema HACCP da plataforma de pescado fresco Auchan. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Frost, F.J., Craun, G.F. & Calderon, R.L. (1996). Waterborne disease surveillance. *Journal American Water Works Association*, 88, 66-75.
- Gaspar, M., Moura, P. & Pereira, F. (2015). Prospeção dos bancos de moluscos bivalves na costa ocidental sul portuguesa (Junho 2014). *Relatórios Científicos e Técnicos do IPMA – Serie Digital*. 6, 1-27.
- Gosling, E. (2004). *Bivalve molluscs: Biology, ecology and culture*. Oxford: Fishing New Books, Blackwell Publishing.
- Grundy, M.M., Ratcliffe, N.A. & Moore, M.N. (1996). Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 42, 187-190.
- Health Protection Agency (2004). *Oxidase test*. National Standard Method BSOP TP 26 Issue 1. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
- Health Protection Agency (2004). *Potassium hydroxide test*. National Standard Method BSOP TP 30 Issue 1. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.

- Health Protection Agency (2006). *Catalase test*. National Standard Method BSOP TP 8 Issue 1. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.
- Huss, H. H. (1997a). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. *FAO Documento Técnico sobre as Pescas*, 334.
- Huss, H. H. (1997b). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper* 348, Rome. FAO.
- Huss, H. H., Ababouch, L. & Gram, L. (2004). *Assessment na management of seafood safety and quality*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. (2nd ed.) Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- .IPMA (2017a). Imagens dos limites das ZDP litorais dos moluscos bivalves vivos. Acedido em Jul. 26, 2017, disponível em: <https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/imagensLimitesZPMBLitorais2017.pdf>
- IPMA (2017b). Lista de espécies. Acedido em Jul. 26, 2017, disponível em: <https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/publicacoes/pescas.mar/lista-especies-bivalves-060717.pdf> International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). *Microorganisms in Foods 2 Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications*. (2nd Ed). (p. 293). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- ISO 7899-1 (1998). *Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 15213 (2003). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 7218 (2007/Amd.1, 2013). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 13720 (2010). *Meat and meat products - Enumeration of presumptive Pseudomonas spp.* International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 4833-2 (2013). *Preview Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 16649-3 (2015). *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Enumeration of b-glucuronidase Positive Escherichia coli - Part 3: Most Probable Number Technique Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-Dglucuronide Acid*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 21872-1 (2017). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of Vibrio spp. - Part 1: Detection of potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus*. International Organization for Standardization, Geneva.
- ISO 6887-3 (2017). *Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the*

preparation of fish and fishery products. International Organization for Standardization, Geneva.

- Jaouen, T., Dé, E., Chevalier, S. & Orange, N. (2004). Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, 6665-6669.
- Kalle, K. (1971). Salinity: general introduction. In Otto Kinne (Eds), *Marine ecology: A comprehensive, integrated treatise on life in oceans and coastal waters*. (pp. 683-688). New York: Wiley-Interscience.
- Lart, W.J. & Hudson, S.A. (1993). *Factors affecting Escherichia coli levels in shellfish with reference to E.E.C. Directive 91/492*. Hull: Seafish Industry Authority.
- Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L. (2008). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO Fisheries Technical Paper*, 511.
- Lee, R. & Murray, L. (2010). Components of microbiological monitoring programmes. In G. Rees, K. Pond, D. Kay, J. Bartram & S. Domingo (Eds.), *Safe management of shellfish and harvest waters: Minimizing health risks from sewage contaminated shellfish*. (pp. 91-108). Publicado em conjunto pela International Water Association e pela World Health Organization, Londres.
- Lee, R.J., & Silk, R. (2013). Sources of variation of *Escherichia coli* concentrations in bivalve molluscs. *Journal of Water and Health*, 11, 78-83.
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 81-116.
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., Prieto, E. & Moreno, O. (2011). The effect of diet on gonadal development of the smooth clam *Callista chione* (Mollusca:Bivalvia). *Journal of Shellfish Research*, 30, 295-301.
- Matias, D. (2008). Produção de Bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal*. (pp. 17-38). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibbs, P. A. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in diferente food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21, 213-216.
- Metaxatos, Angelina (2004). Population Dynamics of the venerid bivalve *Callista Chione* (L.) in a coastal área of the eastern Mediterranean. *Journal of Sea Research*, 52, 293-305.
- Nunes, M. L. (2008). Introdução. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal*. (pp. 11-16). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Organização Mundial da Saúde (2008). Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. França.
- Organização Mundial da Saúde (2010). *Safe management of shellfish and harvest waters*. Londres: IWA Publishing.
- Pedro, S. C. (2007). Produtos da pesca e aquacultura: Aspectos da qualidade e segurança alimentar. Dissertação apresentada para provas públicas de acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Lisboa: IPIMAR.
- Pedro, S., Cachola, R., Nunes, M.L. (2008a). Boas práticas de higiene e de aplicação dos princípios HACCP para os operadores de bivalves vivos. *Publicações avulsas do IPIMAR*. 17, 37.

- Pedro, S., Castilho, M. F. & Silva, H. A. (2008b). Principais perigos associados aos bivalves; contaminantes microbiológicos; Generalidades. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal*. (pp. 74-75). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Pedro, S., Cachola, R., Castilho, M. F. & Sobral M., (2008c). Monitorização sanitária e classificação das zonas de produção; Classificação. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal*. (pp. 107-111). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Portaria nº 1421/2006 de 21 de Dezembro. *Diário da República nº 244/2006 – 1ª Série*. Ministérios da Economia e da Inovação e da Agricultura, Do desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Pruzzo, C., Gallo, G. & Canesi, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7, 761-772.
- PTMA/MIC 04a., 2014. *Procedimento interno para pesquisa e quantificação de estreptococos fecais*. IPMA, I.P./DMRM/DivAV.
- PTMA/MIC 11a., 2017. *Procedimento interno para pesquisa e identificação de Vibrio*. IPMA, I.P./DMRM/DivAV.
- PTMA/MIC 15a., 2014. *Procedimento interno para pesquisa/quantificação de esporos de clostrídios sulfito-redutores*. IPMA, I.P./DMRM/DivAV.
- PTAL 10, 2015. *Procedimento interno para Controlo do pH dos Meios de Cultura*. IPMA, I.P./DMRM/DivAV.
- Ribeiro, A. M. R. (1974). Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Revista de Microbiologia*, 5, 17-25.
- Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia. Estrasburgo.
- Regulamento (CE) nº 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia. Estrasburgo.
- Regulamento (UE) nº 2285/2015 da Comissão, de 8 de Outubro de 2015. Jornal Oficial da União Europeia. Bruxelas.
- Ruano, F., Ramos, P., Quaresma, M., Bandarra, N. M. & Fonseca, I. P. (2012). Avaliação do perfil de ácidos gordos e do Índice de Condição em moluscos bivalves submetidos a diferentes períodos de depuração. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 107, 75-84.
- Savichtcheva, O. & Satoshi, O. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research*, 40, 2463-2476.
- Schmiel, D. H., Young, G. M. & Miller, V. L. (2000). The *Yersinia enterocolitica* phospholipase gene *yplA* is part of the flagellar regulon. *Journal of Bacteriology*, 182, 2314-2320.
- Sea Life Base (2017). *Venerupis corrugata*. Acedido em Fev. 7, 2008, disponível em: <http://www.sealifebase.org/summary/Venerupis-corrugata.html>.
- Silva, H. A., Costa, P. & Rodrigues, S. (2008). Morfologia, Biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. (pp. 17-38). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

- Solic, M., Krstulovic, N., Jozic, S., Curac, D. (1999). The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment International*, 25, 991-1000.
- Todar, K. (2005). *Todar's online textbook of bacteriology*. Wisconsin.
- Tuck, I.D., Bailey, N., Harding, M., Sngster, G., Howell, T., Graham, N. & Breen, M., (2000). The impact of water jet dredging for razor clams, *Ensis* spp., in a shallow sandy subtidal environment. *Journal of Sea Research*, 43, 65-81.
- Vooys, C. G. N. & Zwaan, A. (1978). The rate of oxygen consumption and ammonia excretion by *Mytilus edulis* after various periods of exposure to air. *Biochemistry Physiology*, 60, 343-347.